

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006年10月12日 (12.10.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/106905 A1

- (51) 国際特許分類:  
*CI2N 15/09* (2006.01)    *CI2N 1/19* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)    *CI2N 1/21* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)    *CI2N 5/10* (2006.01)  
*CI2N 1/15* (2006.01)    *CI2P 21/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/306803
- (22) 国際出願日: 2006年3月31日 (31.03.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2005-101105 2005年3月31日 (31.03.2005) JP  
特願2005-378266 2005年12月28日 (28.12.2005) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 井川智之 (IGAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 角田浩行 (TSUNODA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF POLYPEPTIDE BY REGULATION OF ASSEMBLY

(54) 発明の名称: 会合制御によるポリペプチド製造方法

(57) Abstract: It is found that the assembly of polypeptides can be inhibited by altering an amino acid residue that forms the interface between the polypeptides in the assembly into another amino acid residue having the same charge as that of the amino acid residue. Thus, it becomes possible to form a hetero molecule with good efficiency. The present process can be suitably used, for example, in the production of a bispecific antibody.

(57) 要約: ポリペプチド間の会合の際の界面を形成するアミノ酸残基を、同種の電荷を有するアミノ酸へ改変することによって、該会合を抑制することが可能であることを見出した。本発明によって、効率よくヘテロ分子を形成させることができた。本発明は、例えば、二重特異性抗体の作製の際に好適に利用することができる。

WO 2006/106905 A1

## 明細書

### 会合制御によるポリペプチド製造方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、各分子内または各分子間の会合の制御によるポリペプチドの製造方法、各分子内または各分子間の会合が制御されたポリペプチド、および該ポリペプチドを有効成分として含有する医薬組成物等に関する。

#### 背景技術

[0002] 抗体は血中での安定性が高く、副作用も少ないとから医薬品として注目されている。その中には二種類の抗原を同時に認識できる二重特異性抗体がある。現在、臨床試験が行なわれているMDX-210は、Fc $\gamma$  RIを発現しているmonocyte等をHER-2/neuを発現している癌細胞にretargetingするIgG型二重特異性抗体である(非特許文献1参照)。抗体の製造は、一般的に遺伝子組み換え技術を用いることが多い。具体的には、抗体の蛋白質をコードするDNAをハイブリドーマ、抗体を產生する感作リンパ球等の抗体產生細胞、または抗体遺伝子を提示しているファージライプラリーからクローニングし、適当なベクターに組み込み、これを宿主細胞に導入し產生させる技術である。遺伝子組み換え技術を用いたIgG型二重特異性抗体の製造は、目的の二種類のIgGを構成するH鎖及びL鎖の遺伝子、合計4種の遺伝子を細胞に導入し、共発現により分泌させる。このような発現において、野生型のH鎖及びL鎖の構成遺伝子を発現させた場合には、2種類のH鎖の共有結合やH鎖とL鎖の非共有結合はランダムに起こるため、目的の二重特異性抗体の比率は極めて少なくなる。具体的には、目的の二重特異性抗体は10種類中1種類のみであり、生産効率は低下してしまう。目的抗体の生産効率の低下は、目的抗体の精製の障害になるばかりでなく、ロット間差などの不均一性を増大させ、生産コストの肥大を招くことになる。

[0003] 二重特異性抗体の効率的生産に関する知見としては、IgG H鎖のCH3領域にアミノ酸置換を施すことにより、H鎖について異種な組合せのIgGを優先的に分泌させることができが報告されている(特許文献1および非特許文献2および3参照)。具体的には、一方のH鎖のCH3領域に存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(knob;突起)に置換し

、もう一方のH鎖のCH3領域に存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖(hole;空隙)に置換することにより突起が空隙内に配置されえるようにして異種H鎖形成の促進および同種H鎖形成の阻害を引き起こす方法である。H鎖可変領域(以下、VH)とL鎖可変領域(以下、VL)が会合する界面に同様の"knob;突起"と"hole;空隙"を利用した知見も報告されている(非特許文献4参照)。Zheらの報告によると、VHとVLの界面に存在するアミノ酸について2種類(両鎖で4種類)を置換することにより1.28倍効率的にヘテロ分子形成が促進している(野生型;72%、改変体;92%)。また、1種類のアミノ酸置換(両鎖で2種類)では、野生型と同程度の効率となっている。しかし、VHとVLにknob(突起)とhole(空隙)を設ける方法は、ヘテロ分子の形成促進が十分とは言えない。

[0004] 特許文献1:国際公開第96/27011号

非特許文献1:Segal DM ら著、Current Opinion in Immunology、1999年、Vol.11、p.5  
58-562

非特許文献2:Ridgway JB ら著、Protein Engineering、1996年、Vol.9、p.617-621

非特許文献3:Merchant AM ら著、Nature Biotechnology、1998年、Vol.16、p.677-68  
1

非特許文献4:Zhe Z ら著、Protein Science、1997年、Vol.6、p.781-788

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的は、ポリペプチドの会合を制御する方法、および、会合が制御されたポリペプチド、並びに、該ポリペプチドの製造方法を提供することにある。また本発明は、その一態様として、VHとVLの界面における会合を制御して二重特異性抗体を効率よく製造する方法を提供することを目的とする。また、sc(Fv)2の一方の構造異性体を効率よく製造する方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは会合の制御に供するポリペプチドとして抗体のVHおよびVLを選択し、これらVHとVLの会合を制御可能な方法について、銳意研究を行った。

- [0007] その結果、VHとVLの界面に存在するアミノ酸を電荷を有するアミノ酸へ置換することにより、VHとVLの会合を抑制することができ、上述のknobとholeを用いる方法よりも、効率よくヘテロ分子が形成されることを見出した。
- [0008] 驚くべきことに、本発明の方法によれば、VHとVLの界面に存在するそれぞれ1種類のアミノ酸(VHとVLで計2アミノ酸)を置換するだけで、効率よくヘテロ分子を形成させることが可能である。また、抗原性の観点からはアミノ酸の置換は少ない方がよい。本発明の一態様によれば、VHとVLの界面に存在する1つのアミノ酸を置換するだけで効率よくヘテロ分子を形成されることが可能である。
- [0009] 即ち、本発明者らによって見出された知見によって、VHとVLとの会合を制御することが可能である。また、本発明はVHとVLとの会合の制御に適用可能なだけではなく、任意のポリペプチド間の会合の制御に応用することが可能である。
- [0010] さらに本発明者らは、本発明の会合制御方法によって取得された二重特異性抗体が、実際に機能を保持していることを確認した。
- [0011] 上述の如く本発明者らは、任意のポリペプチド間の会合を制御し得る方法の開発に成功し、本発明を完成させた。
- [0012] 本発明は、ポリペプチドの会合を制御する方法、および、会合が制御されたポリペプチド、並びに、該ポリペプチドの製造方法に関し、より具体的には、  
〔1〕 ポリペプチドの会合が制御されるようにポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基に変異を有するポリペプチドの製造方法であって、(a)ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を、ポリペプチド内の会合が阻害されるよう元の核酸から改変し、(b)宿主細胞を該核酸が発現するように培養し、(c)宿主細胞培養物から該ポリペプチドを回収することを含むポリペプチド変異体の製造方法、  
〔2〕 異種多量体の会合が制御されるようにポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基に変異を有する異種多量体の製造方法であって、(a)ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を、ポリペプチド間の会合が阻害される元の核酸から改変し、(b)宿主細胞を該核酸が発現するように培養し、(c)宿主細胞培養物から該異種多量体を回収することを含む異種多量体の製造方法、  
〔3〕 2種以上の構造異性体を形成し得るポリペプチドにおいて、1種以上の構造異

- 性体を形成するポリペプチドの会合が阻害されるように、ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を元の核酸から改変する[1]に記載の方法、  
〔4〕 2種以上の多量体を形成し得る異種多量体において、1種以上の多量体を形成するポリペプチド間の会合が阻害されるように、ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を元の核酸から改変する[2]に記載の方法、  
〔5〕 工程(a)の改変が、界面を形成する2残基以上のアミノ酸残基が同種の電荷となるように該界面にアミノ酸残基の変異が導入されるように、元の核酸を改変することである、[1]または[2]に記載の方法、  
〔6〕 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である[5]に記載の方法、  
〔7〕 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である[5]に記載の方法、  
〔8〕 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である[5]に記載の方法、  
〔9〕 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である[5]に記載の方法、  
〔10〕 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である[5]に記載の方法。  
〔11〕 工程(a)の改変が、界面に存在する疎水性コアを形成するアミノ酸残基が電荷を有するアミノ酸残基となるように該界面にアミノ酸残基の変異が導入されるように、元の核酸を改変することである、[1]または[2]に記載の方法、  
〔12〕 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である[11]に記載の方法、  
〔13〕 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である[11]に記載の方法、  
〔14〕 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である[11]に記載の方法、  
〔15〕 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である[11]に記載の方法、  
〔16〕 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である[11]に記載の方法、  
〔17〕 ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域により形成される[1]または[2]に記載の方法、  
〔18〕 ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖可変領域により形成される[1]または[2]に記載の方法、  
〔19〕 ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域により形成される[1]または[2]に記載の方法、  
〔20〕 ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖定常領域により形成される[1]または[

2]に記載の方法、

[21] ポリペプチドが、2つ以上の重鎖可変領域と2つ以上の軽鎖可変領域をリンクで結合した一本鎖ポリペプチドである[1]に記載の方法、

[22] 異種多量体が、2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む多重特異性抗体である[2]に記載の方法、

[23] 異種多量体が、二重特異性抗体である[22]に記載の方法、

[24] [1]または[2]に記載の方法により製造されるポリペプチド変異体または異種多量体、

[25] ポリペプチド変異体であって、元のポリペプチド内の会合が阻害されるように、該ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基の改変を有するポリペプチド変異体、

[26] 異種多量体であって、元のポリペプチド間の会合が阻害されるように、該ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基の改変を有する異種多量体、

[27] 元のポリペプチドが2種以上の構造異性体を形成し得る、[25]に記載のポリペプチド変異体、

[28] 元のポリペプチドが2種以上の多量体を形成し得る、[26]に記載の異種多量体、

[29] 前記ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面を形成する2残基以上のアミノ酸残基が同種の電荷となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入することである、[25]に記載のポリペプチド変異体または[26]に記載の異種多量体、

[30] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である[29]に記載のポリペプチド変異体または異種多量体、

[31] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である[29]に記載のポリペプチド変異体または異種多量体、

[32] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である[29]に記載のポリペプチド変異体または異種多量体、

[33] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である[29]に記載のポリペプチド変

異体または異種多量体、

[34] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である[29]に記載のポリペプチド変異体または異種多量体、

[35] 前記ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面に存在する疎水性コアを形成するアミノ酸残基が電荷を有するアミノ酸残基となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入することである[25]に記載のポリペプチド変異体または[26]に記載の異種多量体、

[36] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である[35]に記載のポリペプチド変異体または異種多量体、

[37] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である[35]に記載のポリペプチド変異体または異種多量体、

[38] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である[35]に記載のポリペプチド変異体または異種多量体、

[39] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である[35]に記載のポリペプチド変異体または異種多量体、

[40] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である[35]に記載のポリペプチド変異体または異種多量体、

[41] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域により形成される[25]に記載のポリペプチド変異体または[26]に記載の異種多量体、

[42] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖可変領域により形成される[25]に記載のポリペプチド変異体または[26]に記載の異種多量体、

[43] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域により形成される[25]に記載のポリペプチド変異体または[26]に記載の異種多量体、

[44] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖定常領域により形成される[25]に記載のポリペプチド変異体または[26]に記載の異種多量体、

[45] ポリペプチドが、2つ以上の重鎖可変領域と2つ以上の軽鎖可変領域をリンクで結合した一本鎖ポリペプチドである[25]に記載のポリペプチド変異体、

[46] 異種多量体が、2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む

- 多重特異性抗体である[26]に記載の異種多量体、
- [47] 異種多量体が、二重特異性抗体である[46]に記載の異種多量体、
- [48] [25]に記載のポリペプチド変異体または[26]に記載の異種多量体、および医薬的に許容される担体を含む組成物、
- [49] [25]に記載のポリペプチド変異体または[26]に記載の異種多量体をコードする核酸、
- [50] [49]に記載の核酸を有する宿主細胞、
- [51] [50]に記載の宿主細胞を培養する工程、細胞培養物からポリペプチドを回収する工程を含む[25]に記載のポリペプチド変異体または[26]に記載の異種多量体の製造方法、
- [52] ポリペプチドの会合制御方法であって、ポリペプチド内の会合が阻害されるように、元のポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基を改変することを含むポリペプチドの会合制御方法、
- [53] 異種多量体の会合制御方法であって、ポリペプチド間の会合が阻害されるように、元のポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基を改変することを含む異種多量体の会合制御方法、
- [54] 2種以上の構造異性体を形成し得るポリペプチドにおいて、1種以上の構造異性体を形成するポリペプチドの会合が阻害されるように、ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基を改変する[52]に記載の方法、
- [55] 2種以上の多量体を形成し得る異種多量体において、1種以上の多量体を形成するポリペプチド間の会合が阻害されるように、ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基を改変する[53]に記載の方法、
- [56] 前記ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面を形成する2残基以上のアミノ酸残基が同種の電荷となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入することである、[52]または[53]に記載の方法、
- [57] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である[56]に記載の方法、
- [58] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である[56]に記載の方法、
- [59] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である[56]に記載の方法、

- [60] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である[56]に記載の方法、
- [61] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である[56]に記載の方法、
- [62] 前記ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面に存在する疎水性コアを形成するアミノ酸残基が電荷を有するアミノ酸残基となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入することである、[52]または[53]に記載の方法、
- [63] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である[62]に記載の方法、
- [64] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である[62]に記載の方法、
- [65] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である[62]に記載の方法、
- [66] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である[62]に記載の方法、
- [67] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である[62]に記載の方法、
- [68] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域により形成される[52]または[53]に記載の方法、
- [69] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖可変領域により形成される[52]または[53]に記載の方法、
- [70] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域により形成される[52]または[53]に記載の方法、
- [71] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖定常領域により形成される[52]または[53]に記載の方法、
- [72] ポリペプチドが、2つ以上の重鎖可変領域と2つ以上の軽鎖可変領域をリンクで結合した一本鎖ポリペプチドである[52]に記載の方法、
- [73] 異種多量体が、2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む多重特異性抗体である[53]に記載の方法、
- [74] 異種多量体が、二重特異性抗体である[73]に記載の方法、
- [75] 重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体であって、以下の(1)および(2)のアミノ酸残基が同種の電荷を有するアミノ酸残基である抗体、
  - (1)重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における39位(グルタミン)に相当するアミノ酸残基
  - (2)軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:8に記載のアミノ酸

配列における44位(グルタミン)に相当するアミノ酸残基

[76] 重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体であって、以下の(1)および(2)のアミノ酸残基が同種の電荷を有するアミノ酸残基である抗体、

(1) 重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における45位(ロイシン)に相当するアミノ酸残基

(2) 軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における50位(プロリン)に相当するアミノ酸残基

[77] 重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体であって、以下の(1)または(2)のいずれか一方が電荷を有するアミノ酸残基である抗体、

(1) 重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における45位(ロイシン)に相当するアミノ酸残基

(2) 軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における50位(プロリン)に相当するアミノ酸残基

[78] 前記同種の電荷を有するアミノ酸残基が、以下の(a)または(b)いずれかの群に含まれるアミノ酸残基から選択される[75]または[76]に記載の抗体:

(a) グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)；

(b) リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)、

[79] 前記電荷を有するアミノ酸残基が、グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)、リジン(K)、アルギニン(R)またはヒスチジン(H)である[77]に記載の抗体、

[80] ポリペプチドが、2つ以上の重鎖可変領域と2つ以上の軽鎖可変領域をリンクで結合した一本鎖ポリペプチドである[75]～[77]のいずれか1項に記載の抗体、

[81] ポリペプチドが、2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む多重特異性抗体である[75]～[77]のいずれか1項に記載の抗体、

[82] ポリペプチドが、二重特異性抗体である[81]に記載の抗体、

[83] [75]～[77]のいずれか1項に記載の抗体および医薬的に許容される担体を含む組成物、

[84] [75]～[77]のいずれか1項に記載の抗体を構成するポリペプチドをコードする核酸、

[85] [84]に記載の核酸を有する宿主細胞、

[86] [85]に記載の宿主細胞を培養する工程、細胞培養物からポリペプチドを回収する工程を含む[75]～[77]のいずれか1項に記載の抗体の製造方法、

[87] 2種以上の重鎖CH3領域を含む抗体であって、第1の重鎖CH3領域における以下の(1)～(3)に示すアミノ酸残基の組から選択される1組ないし3組のアミノ酸残基が同種の電荷を有する抗体、

(1) 重鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバーリングによる356位および439位のアミノ酸残基

(2) 重鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバーリングによる357位および370位のアミノ酸残基

(3) 重鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバーリングによる399位および409位のアミノ酸残基

[88] 第2の重鎖CH3領域における前記(1)～(3)に示すアミノ酸残基の組から選択されるアミノ酸残基の組であって、前記第1の重鎖CH3領域において同種の電荷を有する前記(1)～(3)に示すアミノ酸残基の組に対応する1組ないし3組のアミノ酸残基が、前記第1の重鎖CH3領域における対応するアミノ酸残基とは反対の電荷を有する[87]に記載の抗体、

[89] 前記同種の電荷を有するアミノ酸残基が、以下の(a)または(b)いずれかの群に含まれるアミノ酸残基から選択される[87]に記載の抗体：

(a) グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)；

(b) リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)、

[90] 前記第1の重鎖CH3領域と第2の重鎖CH3領域がジスルフィド結合により架橋している[87]に記載の抗体、

[91] 2種以上の重鎖定常領域を有する抗体である[87]に記載の抗体、

[92] 2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む多重特異性抗体である[87]に記載の抗体、

[93] 二重特異性抗体である[92]に記載の抗体、

[94] [87]に記載の抗体および医薬的に許容される担体を含む組成物、

- [95] [87]に記載の抗体を構成するポリペプチドをコードする核酸、
- [96] [95]に記載の核酸を有する宿主細胞、
- [97] [96]に記載の宿主細胞を培養する工程、細胞培養物からポリペプチドを回収する工程を含む[87]に記載の抗体の製造方法、を提供するものである。

### 図面の簡単な説明

- [0013] [図1]ヒト化SB04のFv領域をモデリングした図であり、(A)VHとVL界面のアミノ酸残基であるH39とL38、(B)VHとVL界面のアミノ酸残基であるH45とL44を示している。
- [図2]H39とL38の改変抗体におけるH鎖とL鎖の会合について評価した結果を示す写真である。結果、全ての改変抗体において野生型と比較して目的とする抗体の会合比率の上昇を示した。レーンの説明M:分子量マーカー1:ヒト化XB12 H鎖(Q) + ヒト化XB12 L鎖(Q)、2:ヒト化XB12 H鎖(Q) + ヒト化SB04 L鎖(Q)、3:野生型:ヒト化XB12 H鎖(Q) + ヒト化XB12 L鎖(Q) + ヒト化SB04 L鎖(Q)、4:D改変型:ヒト化XB12 H鎖(D) + ヒト化XB12 L鎖(Q) + ヒト化SB04 L鎖(D)、5:E改変型:ヒト化XB12 H鎖(E) + ヒト化XB12 L鎖(Q) + ヒト化SB04 L鎖(E)、6:R改変型:ヒト化XB12 H鎖(R) + ヒト化XB12 L鎖(Q) + ヒト化SB04 L鎖(R)、7:K改変型:ヒト化XB12 H鎖(K) + ヒト化XB12 L鎖(Q) + ヒト化SB04 L鎖(K)
- [図3]H39とL38の改変抗体における凝固活性について評価した結果を示している。結果、XB12 H鎖(H39)とSB04 L鎖(L38)をGluに改変した二重特異性抗体が野生型と同等以上の凝固活性を示した。
- [図4]H39とL38の改変抗体におけるFactorIXa結合活性について評価した結果を示している。結果、全ての改変抗体において野生型と同等の結合活性を示した。
- [図5]H39とL38の改変抗体におけるFactorX結合活性について評価した結果を示している。結果、全ての改変抗体において野生型と同等の結合活性を示した。
- [図6]L44の改変抗体におけるH鎖とL鎖の会合について評価した結果を示す写真である。結果、全ての改変抗体において野生型と比較して目的とする抗体の会合比率の上昇を示した。レーンの説明1:野生型:ヒト化XB12 H鎖 + ヒト化XB12 L鎖(P) + ヒト化SB04 L鎖(P)、2:D改変型:ヒト化XB12 H鎖 + ヒト化XB12 L鎖(P) + ヒト化SB04 L鎖(D)、3:E改変型:ヒト化XB12 H鎖 + ヒト化XB12 L鎖(P) + ヒト化SB04 L鎖(E)、4:R改変

型:ヒト化XB12 H鎖 + ヒト化XB12 L鎖(P) + ヒト化SB04 L鎖(R)、5:K改変型:ヒト化XB12 H鎖 + ヒト化XB12 L鎖(P) + ヒト化SB04 L鎖(K)

[図7]L44の改変抗体における凝固活性について評価した結果を示している。結果、全ての改変抗体において野生型を上回る凝固活性を示した。

[図8]L44の改変抗体におけるFactorX結合活性について評価した結果を示している。結果、全ての改変抗体において野生型と同等の結合活性を示した。

[図9]H39、L38およびL44の改変抗体におけるH鎖とL鎖の会合について評価した結果を示す写真である。結果、全ての改変抗体において野生型と比較して目的とする抗体の会合比率の上昇を示した。レーンの説明1:野生型:ヒト化XB12 H鎖(H39: Q) + ヒト化XB12 L鎖(L38: Q) + ヒト化SB04 L鎖(L38: Q, L44: P)、2:E+D改変型:ヒト化XB12 H鎖(H39: E) + ヒト化XB12 L鎖(L38: Q) + ヒト化SB04 L鎖(L38: E, L44: D)、3:E+E改変型:ヒト化XB12 H鎖(H39: E) + ヒト化XB12 L鎖(L38: Q) + ヒト化SB04 L鎖(L38: E, L44: E)、4:E+R改変型:ヒト化XB12 H鎖(H39: E) + ヒト化XB12 L鎖(L38: Q) + ヒト化SB04 L鎖(L38: E, L44: R)、5:E+K改変型:ヒト化XB12 H鎖(H39: E) + ヒト化XB12 L鎖(L38: Q) + ヒト化SB04 L鎖(L38: E, L44: K)、M:分子量マーカー

[図10]H39、L38およびL44の改変抗体における凝固活性について評価した結果を示している。結果、XB12 H鎖(H39)およびSB04 L鎖(L38, L44)を改変した二重特異性抗体が野生型と同等以上の凝固活性を示した。

[図11]H39、L38およびL44の改変抗体におけるFactorIXa結合活性について評価した結果を示している。結果、全ての改変抗体において野生型と同等の結合活性を示した。

[図12]2種の重鎖可変領域(VH1とVH2)および2種の軽鎖可変領域(VL1とVL2)を含むsc(Fv)2の構造の一例を模式的に示す図である。(a)の構造のsc(Fv)2は、主に、(b)で示す2種の型の構造異性体が存在する。

[図13]u2-wz4の構造異性体であるpeak1とpeak2の陽イオン交換クロマトグラフィーによる分離の結果を示す。

[図14]陽イオン交換クロマトグラフィーにより分離したpeak1とpeak2のペプチドマッピングを示す。

[図15]u2-wz4の構造異性体であるpeak1とpeak2、分離前のu2-wz4のsubtilisin処理後の還元SDS-PAGEの結果を示す写真である。得られたバンドの構造を右に示した。

[図16]bivalent scFvとsingle chain antibodyの構造の違いにより生じるsubtilisin限定分解後の分解パターンの違いを示す。Bivalent scFv構造の場合、点線で囲った低分子量断片が生じる。

[図17]u2-wz4の構造異性体であるpeak1とpeak2、分離前のu2-wz4のSubtilisinによる限定分解後のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す。矢印により低分子量ピークの溶出位置を示した。

[図18]MG10-GST融合蛋白質固定化カラムで精製した後のu2-wz4、改変体v1、改変体v3のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す。

[図19]u2-wz4、改変体v1、改変体v3の陽イオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。

[図20]u2-wz4、u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3の等電点電気泳動の結果を示す写真である。

[図21]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3のプロテアーゼ限定分解後のゲルろ過クロマトグラフィー分析の結果を示す。

[図22]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3 のTPO様アゴニスト活性評価の結果を示す。

[図23]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3のDSC分析の結果を示す。

[図24]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3の熱加速試験におけるゲルろ過クロマトグラフィー分析より得られたモノマー残存率を示す。

[図25]u2-wz4精製peak1、u2-wz4精製peak2、改変体v1、改変体v3の熱加速試験における陽イオン交換クロマトグラフィー分析より得られた構造異性体含有比率を示す。

[図26]ヒト化二重特異性抗体(ヒト化A69 (hA69-PFL) / ヒト化B26 (hB26-PF)/ヒト化BA (hAL-AQ))の凝固活性について評価した結果を示している。結果、キメラ二重特

異性抗体と同等以上の凝固活性を示した。

[図27]H鎖定常領域を改変して二重特異性抗体の形成効率を向上させるための概念図である。改変箇所番号については、EUナンバーリング(Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)を採用した。

[図28]CH3界面を改変したヒト化二重特異性抗体(IgG4型)のIEX分析のクロマトグラムを示した。

[図29]CH3界面を改変したヒト化二重特異性抗体(IgG4型)のIEX分析により得られたA-Homo, BiAb, B-Homoの形成比率を示した。

[図30]CH3界面を改変したヒト化二重特異性抗体(IgG4型)より精製されたBiAbの60°C-1Wの熱加速試験後のモノマー残存率を示した。

[図31]CH3界面を改変したヒト化二重特異性抗体(IgG4型)の凝固活性について評価した結果を示している。結果、未改変の二重特異性抗体と同等の凝固活性を示した。

[図32]CH3界面を改変したヒト化二重特異性抗体(IgG1型)のA-Homo, BiAb, B-HomoのIEX分析により得られた形成比率を示した。

#### 発明を実施するための最良の形態

- [0014] 本発明は、ポリペプチドの会合、またはポリペプチドによって構成される異種多量体の会合を制御する方法に関する。
- [0015] まず本発明は、ポリペプチドの会合制御方法であって、ポリペプチド内の会合が阻害されるように、元のポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基を改変することを含むポリペプチドの会合制御方法を提供する。
- [0016] 本発明におけるポリペプチドとは、通常、10アミノ酸程度以上の長さを有するペプチド、およびタンパク質を指す。また、通常、生物由来のポリペプチドであるが、特に限定されず、例えば、人工的に設計された配列からなるポリペプチドであってもよい。また、天然ポリペプチド、あるいは合成ポリペプチド、組換えポリペプチド等のいずれであってもよい。さらに、上記のポリペプチドの断片もまた、本発明のポリペプチドに含まれる。
- [0017] 本発明におけるポリペプチドの会合とは、例えば、2以上のポリペプチド領域が相

互作用する状態を指すものと換言することができる。

- [0018] 本発明において「会合を制御する」とは、所望の会合状態になるように制御することを言い、より具体的には、ポリペプチド内において望ましくない会合が形成されないように制御することを言う。
- [0019] 本発明における「界面」とは、通常、会合(相互作用)する際の会合面を指し、界面を形成するアミノ酸残基とは、通常、その会合に供されるポリペプチド領域に含まれる1もしくは複数のアミノ酸残基であって、より好ましくは、会合の際に接近し相互作用に関与するアミノ酸残基を言う。該相互作用には、具体的には、会合の際に接近するアミノ酸残基同士が水素結合、静電的相互作用、塩橋を形成している場合等が含まれる。
- [0020] 本発明における「界面を形成するアミノ酸残基」とは、詳述すれば、界面を構成するポリペプチド領域において、該ポリペプチド領域に含まれるアミノ酸残基を言う。界面を構成するポリペプチド領域とは、一例を示せば、抗体、リガンド、レセプター、基質等において、その分子内、もしくは分子間において選択的な結合を担うポリペプチド領域を指す。具体的には、抗体においては、重鎖可変領域、軽鎖可変領域等を例示することができる。
- [0021] 本発明の方法におけるアミノ酸残基の「改変」とは、具体的には、元のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基へ置換すること、元のアミノ酸残基を欠失させること、新たなアミノ酸残基を付加すること等を指すが、好ましくは、元のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基へ置換することを指す。
- [0022] また、本発明における「ポリペプチド」は、好ましくは、2種以上の構造異性体を形成し得るポリペプチドである。該構造異性体とは一般的に、アミノ酸配列は同一であるが、立体構造(三次構造)が異なるタンパク質同士を指す。通常、構造異性体同士では化学的又は物理的性質のうち少なくとも1つは異なることが多い。
- [0023] 本発明の好ましい態様においては、2種以上存在し得る構造異性体の中から所望の構造異性体を優先的(効率的)に取得するための方法に関する。即ち、一態様としては、2種以上の構造異性体を形成し得るポリペプチドにおいて、1種以上の構造異性体を形成するポリペプチド間の会合が阻害されるように、ポリペプチド内の界面を

形成するアミノ酸残基を改変する方法に関する。

- [0024] 例えば、ポリペプチド内において、第一～第四のポリペプチド領域が存在し、これらの任意の2の領域が会合し得る場合、(1)第一および第二のポリペプチド領域が会合し、さらに、第三および第四のポリペプチド領域が会合する、(2)第一および第三のポリペプチド領域が会合し、さらに、第二および第四のポリペプチド領域が会合する、(3)第一および第四のポリペプチド領域が会合し、さらに、第二および第三のポリペプチド領域が会合する場合が考えられ、主に3種の構造異性体が存在し得る。
- [0025] 上記の状況において(1)のように会合したポリペプチド(構造異性体)を優先的に取得したい場合には、例えば、第一のポリペプチド領域が第三および第四のポリペプチド領域との会合が阻害されるように、これら第一、三または四のポリペプチド領域に存在する界面を形成するアミノ酸残基を改変することを挙げることができる。
- [0026] また本発明の方法は、異種多量体の会合制御方法であって、ポリペプチド間の会合が阻害されるように、元のポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基を改変することを含む異種多量体の会合制御方法に関する。
- [0027] 本発明において「異種多量体(ヘテロマルチマー)」とは、複数種のポリペプチドから構成され、該ポリペプチドが互いに会合し得るタンパク質の多量体を言う。より詳細には、「異種多量体」は、少なくとも第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドを有し、ここにおいて第二のポリペプチドはアミノ酸配列において第一のポリペプチドとは少なくとも1個のアミノ酸残基が異なる分子である。また、特に限定されないが、該異種多量体は、少なくとも2種の異なるリガンド、抗原、レセプター、または基質等に対して結合特異性を有することが好ましい。該異種多量体は、第一および第二のポリペプチドにより形成される「異種二量体」に加えて、さらに別の種のポリペプチドが存在していてもよい。即ち、本発明の「異種多量体」は、異種二量体に制限されず、例えば、異種三量体、異種四量体等も含まれる。
- [0028] 上記方法の好ましい態様においては、2種以上の多量体を形成し得る異種多量体について、1種以上の多量体を形成するポリペプチド間の会合が阻害されるように、ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基を改変する方法である。
- [0029] 例えば、第一～第四のポリペプチドから構成されるタンパク質多量体において、こ

れらの任意の2のポリペプチドが会合し得る場合、(1)第一および第二のポリペプチドが会合し、さらに、第三および第四のポリペプチドが会合した多量体、(2) 第一および第三のポリペプチドが会合し、さらに、第二および第四のポリペプチドが会合した多量体、または、(3) 第一および第四のポリペプチドが会合し、さらに、第二および第三のポリペプチドが会合した多量体、が主に存在し得る。

- [0030] 上記の状況において(1)のように会合した多量体を優先的に取得したい場合には、例えば、第一のポリペプチドが第三および第四のポリペプチドと会合が阻害されるよう、これら第一、三または四のポリペプチドに含まれるアミノ酸残基を改変することを挙げることができる。
- [0031] 本発明のポリペプチドの会合制御方法の好ましい態様においては、例えば、ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面を形成する2残基以上のアミノ酸残基が同種の電荷となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入することを特徴とする方法である。
- [0032] 上記方法においては、界面において会合に関与する2以上のアミノ酸残基が互いに同種の電荷となるように改変されることにより、その電荷の反発力によって、これらアミノ酸残基同士の会合が阻害されるものと考えられる。
- [0033] 従って、上記方法において、改変されるアミノ酸残基は、界面を形成するポリペプチド領域間において、会合の際に互いに接近した2以上のアミノ酸残基であることが好ましい。
- [0034] 会合の際に接近するアミノ酸残基は、例えば、ポリペプチドの立体構造を解析し、該ポリペプチドの会合の際に界面を形成するポリペプチド領域のアミノ酸配列を調べることにより見出すことができる。界面において互いに接近したアミノ酸残基は、本発明の方法における「改変」の好ましいターゲットとなる。
- [0035] アミノ酸の中には、電荷を帯びたアミノ酸が知られている。一般的に正の電荷を帶びたアミノ酸(正電荷アミノ酸)としては、リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)が知られている。負の電荷を帶びたアミノ酸(負電荷アミノ酸)としては、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)等が知られている。従って、好ましくは、本発明において同種の電荷のアミノ酸とは、正の電荷同士のアミノ酸、あるいは負の電荷同士のアミノ酸を言う

。

- [0036] 本発明の方法においては、変異する全てのアミノ酸残基が同種の電荷となるように改変されることが好ましいが、この場合に必ずしも限定されず、例えば、改変によって導入されるアミノ酸残基が複数の場合、これらアミノ酸残基の中に電荷を持たないアミノ酸残基が少數程度含まれていてもよい。
- [0037] 本発明の方法において改変に供されるアミノ酸残基の数は、特に制限されないが、例えば、抗体の可変領域を改変する場合、抗原との結合活性を低下させないために、また抗原性を上げるために、なるべく少數のアミノ酸残基を改変することが好ましい。本発明の方法は、後述の実施例で示すように、界面において近接する2つのアミノ酸残基の双方もしくは一方を改変することにより、会合を制御することが可能である。上記「少數」とは、例えば、1～10個程度の数、好ましくは、1～5程度の数、より好ましくは1～3程度の数、最も好ましくは1または2を表す。
- [0038] 本発明の好ましい態様においては、改変によって導入される(改変に供される)アミノ酸残基が全て上記の正電荷アミノ酸の中から選択されるアミノ酸残基であるか、もしくは、全て上記の負電荷アミノ酸の中から選択されるアミノ酸残基であることが好ましい。
- [0039] また、本発明において導入されるアミノ酸残基は、好ましくは、グルタミン酸(E)、アスパラギン(D)、リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)である。
- [0040] なお、元の(改変前の)ポリペプチドにおいて、界面を形成するアミノ酸残基(X)が既に電荷を有する場合、会合の際に該アミノ酸残基と近接し相対するアミノ酸残基を、該アミノ酸残基(X)と同一のアミノ酸残基(もしくは同種の電荷のアミノ酸残基)となるよう改変することも本発明の好ましい態様の一つである。この態様においては、界面を形成するアミノ酸残基の一方を改変すればよい。
- [0041] また、本発明の会合制御方法の好ましい態様においては、ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面に存在する疎水性コアを形成するアミノ酸残基が電荷を有するアミノ酸残基となるように、該界面にアミノ酸残基の変異を導入することを特徴とする方法である。
- [0042] 一般的に、「疎水性コア(hydrophobic core)」は、会合したポリペプチドの内側に疎

水性アミノ酸の側鎖が集合して形成する部分を指す。疎水性アミノ酸は、例えばアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、バリンなどが含まれる。また、疎水コアの形成には、疎水性アミノ酸以外のアミノ酸残基(例えばチロシン)が関わることもある。この疎水性コアは、親水性アミノ酸の側鎖が外側に露出する親水性表面とともに、水溶性のポリペプチドの会合を進める駆動力となる。異なる2つのドメインの疎水性アミノ酸が分子表面に存在し、水分子に暴露されるとエントロピーが増大し自由エネルギーが増大してしまう。よって、2つのドメインは自由エネルギーを減少させ、安定化するために、互いに会合し、界面の疎水性アミノ酸は分子内部に埋もれ、疎水コアを形成することになる。

- [0043] ポリペプチドの会合が起こる際に、疎水性コアを形成する疎水性アミノ酸から電荷を持つ極性アミノ酸へ改変することにより、疎水性コアの形成が阻害され、その結果、ポリペプチドの会合が阻害されるものと考えられる。
- [0044] 当業者においては、所望のポリペプチドについてアミノ酸配列を解析することにより、疎水性コアの存在の有無、および形成部位(領域)等を知ることが可能である。即ち本発明は、界面において疎水性コアを形成し得るアミノ酸残基について、電荷を有するアミノ酸残基へ改変することを特徴とする、会合制御方法である。
- [0045] 上記方法における電荷を有するアミノ酸残基としては、好ましくは、グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)、リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)を挙げることができる。
- [0046] 本発明の会合制御方法は、抗体もしくは抗体断片、および抗体様活性を有するポリペプチド等の製造において、目的の抗体(ポリペプチド)を優先的に取得(製造)する方法に利用することができる。
- [0047] 本発明において、「抗体」という用語は最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体変異体(キメラ抗体、ヒト化抗体、低分子化抗体(抗体断片も含む)、多重特異性抗体等)が含まれる。また、本発明において「抗体」は、ポリペプチドあるいは異種多量体のいずれであってもよい。好ましい抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、並びに、及び抗体断片等の低分子化抗体である。本発明においては、これら抗体の取得(作成)の際に、好適に本発明の会合制御方法を用いることができる。

- [0048] 本発明において「多重特異性抗体」(本明細書では「多種特異性抗体」と同じ意味で使用する)とは、異なる多種のエピトープと特異的に結合し得る抗体を言う。つまり、多重特異性抗体は少なくとも2種類の異なるエピトープに対して特異性を有する抗体であり、異なる抗原を認識する抗体のほか、同一の抗原上の異なるエピトープを認識する抗体も含まれる。(例えば、抗原がヘテロ受容体の場合には、多重特異性抗体はヘテロ受容体を構成する異なるドメインを認識する、あるいは、抗原がモノマーの場合には、多重特異性抗体はモノマー抗原の複数箇所を認識する)。通常、このような分子は2個の抗原と結合するものであるが(二重特異性抗体: bispecific抗体; 本明細書では「二種特異性抗体」と同じ意味で使用する)、それ以上の(例えば、3種類の)抗原に対して特異性を有していてもよい。
- [0049] 本発明における「抗体」には、上述の抗体に対してさらにアミノ酸の置換、欠失、付加及び／若しくは挿入、またはキメラ化やヒト化等により、そのアミノ酸配列が改変されたものが含まれる。アミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入、並びにヒト化、キメラ化などのアミノ酸配列の改変は、当業者に公知の方法により行うことが可能である。同様に、本発明における抗体を組換え抗体として作製する際に利用する抗体の可変領域及び定常領域も、アミノ酸の置換、欠失、付加及び／若しくは挿入、またはキメラ化やヒト化等によりそのアミノ酸配列を改変してもよい。
- [0050] 本発明における抗体はマウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ラクダ抗体など、どのような動物由来の抗体でもよい。さらに、例えば、キメラ抗体、中でもヒト化抗体などのアミノ酸配列を置換した改変抗体でもよい。また、各種分子を結合させた抗体修飾物、抗体断片、低分子化抗体などいかなる抗体でもよい。
- [0051] 「キメラ抗体」とは、異なる動物由来の配列を組合させて作製される抗体である。例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変(V)領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常(C)領域からなる抗体を例示することができる。キメラ抗体の作製は公知であり、例えば、抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによりキメラ抗体を得ることができる。
- [0052] 「ヒト化抗体」とは、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称される、ヒト以外の哺乳動物由

来の抗体、例えばマウス抗体の相補性決定領域(CDR;complementarity determining region)をヒト抗体のCDRへ移植したものである。CDRを同定するための方法は公知である(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877)。また、その一般的な遺伝子組換え手法も公知である(欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576 号公報参照)。そこで公知の方法により、例えば、マウス抗体のCDRを決定し、該CDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region;FR)とが連結された抗体をコードするDNAを取得し、ヒト化抗体を通常の発現ベクターを用いた系により產生することができる。このようなDNAは、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成することができる(WO98/13388号公報に記載の方を参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、CDRが良好な抗原結合部位を形成するように選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるFRのアミノ酸を改変してもよい(Sato et al., Cancer Res. (1993) 53: 851-6)。改変できるFR中のアミノ酸残基には、抗原に直接、非共有結合により結合する部分(Amit et al., Science (1986) 233: 747-53)、CDR構造に影響または作用する部分(Chothia et al., J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17)及びVH-VL相互作用に関連する部分(EP239400号特許公報)が含まれる。

本発明における抗体がキメラ抗体またはヒト化抗体である場合には、これらの抗体のC領域は、好ましくはヒト抗体由來のものが使用される。例えばH鎖では、C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3、C $\gamma$ 4を、L鎖ではC $\kappa$ 、C $\lambda$ を使用することができる。また、抗体またはその產生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を必要に応じ修飾してもよい。本発明におけるキメラ抗体は、好ましくはヒト以外の哺乳動物由來抗体の可変領域とヒト抗体由來の定常領域とからなる。一方、ヒト化抗体は、好ましくはヒト以外の哺乳動物由來抗体のCDRと、ヒト抗体由來のFRおよびC領域とからなる。可変領域については、(3)-3.においてまとめて説明する。ヒト抗体由來の定常領域は、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプごとに固有のアミノ酸配列を有する。本発明におけるヒト化抗体に用いられる定常領域は、どのアイソタイプに属する抗

体の定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域が用いられるが、これに限定されるものではない。また、ヒト化抗体に利用されるヒト抗体由来のFRも特に限定されず、どのアイソタイプに属する抗体のものであってもよい。

- [0053] 本発明におけるキメラ抗体及びヒト化抗体の可変領域及び定常領域は、元の抗体の結合特異性を示す限り、欠失、置換、挿入及び／または付加等により改変されてもよい。
- [0054] ヒト由来の配列を利用したキメラ抗体及びヒト化抗体は、ヒト体内における抗原性が低下しているため、治療目的などでヒトに投与する場合に有用と考えられる。
- [0055] また、低分子化抗体は、体内動態の性質の面からも、大腸菌、植物細胞等を用いて低成本で製造できる点からも抗体として有用である。
- [0056] 抗体断片は低分子化抗体の一種である。また、低分子化抗体は、抗体断片をその構造の一部とする抗体も含む。本発明における低分子化抗体は、抗原への結合能を有していれば特にその構造、製造法等は限定されない。低分子化抗体の中には、全長抗体よりも高い活性を有する抗体も存在する(Orlita et al., Blood(2005) 105: 562-566)。本明細書において、「抗体断片」とは、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分であれば特に限定されないが、重鎖可変領域(VH)又は軽鎖可変領域(VL)を含んでいることが好ましい。好ましい抗体断片の例としては、例えば、Fab、F(ab')2、Fab'、Fvなどを挙げることができる。抗体断片中の、VHまたはVLのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入により改変されてもよい。さらに抗原への結合能を保持する限り、VH及びVLの一部を欠損させてもよい。例えば、前述の抗体断片のうち「Fv」は、完全な抗原認識部位と結合部位を含む最小の抗体断片である。「Fv」は、1つのVHおよび1つのVLが非共有結合により強く結合したダイマー(VH-VLダイマー)である。各可変領域の3つの相補鎖決定領域(complementarity determining region; CDR)によって、VH-VLダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6つのCDRが抗体に抗原結合部位を付与している。しかしながら、1つの可変領域(または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)であっても、全結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を有する。従って、このようなFvより小さい分子も本発明における抗体断片に含まれる。又、抗体断片の可変領域はキ

メラ化やヒト化されていてもよい。

- [0057] 低分子化抗体は、VHとVLの両方を含んでいることが好ましい。低分子化抗体の例としては、Fab、Fab'、F(ab')2及びFv等の抗体断片、並びに、抗体断片を利用して作製され得るscFv(シングルチェインFv) (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85: 5879–83; Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenborg 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269–315, (1994))、Diabody (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 6444–8; EP404097号; WO93/11161号; Johnson et al., Method in Enzymology (1991) 203: 88–98; Holliger et al., Protein Engineering (1996) 9: 299–305; Perisic et al., Structure (1994) 2: 1217–26; John et al., Protein Engineering (1999) 12(7): 597–604; Atwell et al., Mol. Immunol. (1996) 33: 1301–12)、sc(Fv)2 (Hudson et al., J. Immunol. Methods (1999) 231: 177–89; Orita et al., Blood (2005) 105: 562–566)、Triabody (Journal of Immunological Methods (1999) 231: 177–89)、及びTandem Diabody (Cancer Research (2000) 60: 4336–41)等を挙げることができる。
- [0058] 抗体断片は、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシン等のプロテアーゼにより処理して得ることができる (Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods (1992) 24: 107–17; Brennan et al., Science (1985) 229: 81参照)。また、該抗体断片のアミノ酸配列を基に、遺伝子組換えにより製造することもできる。
- [0059] 抗体断片を改変した構造を有する低分子化抗体は、酵素処理若しくは遺伝子組換えにより得られた抗体断片を利用して構築することができる。又は、低分子化抗体全体をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させることもできる(例えば、Co et al., J. Immunol. (1994) 152: 2968–76; Bette and Horwitz, Methods Enzymol. (1989) 178: 476–96; Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol. (1989) 178: 497–515; Lamoyi, Methods Enzymol. (1986) 121: 652–63; Rousseaux et al., Methods Enzymol. (1986) 121: 663–9; Bird and Walker, Trends Biotechnol. (1991) 9: 132–7参照)。
- [0060] また、上記「scFv」は、2つの可変領域を、必要に応じリンカー等を介して、結合させた一本鎖ポリペプチドである。scFvに含まれる2つの可変領域は、通常、1つのVHと1

つのVLであるが、2つのVH又は2つのVLであってもよい。一般にscFvポリペプチドは、VH及びVLドメインの間にリンカーを含み、それにより抗原結合のために必要なVH及びVLの対部分が形成される。通常、同じ分子内でVH及びVLの間で対部分を形成させるために、一般に、VH及びVLを連結するリンカーを10アミノ酸以上の長さのペプチドリンカーとする。しかしながら、本発明におけるscFvのリンカーは、scFvの形成を妨げない限り、このようなペプチドリンカーに限定されるものではない。scFvの総説として、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibody』Vol.113(Rosenburg and Moore ed., Springer Verlag, NY, pp.269–315 (1994))を参照することができる。

- [0061] また、「ダイアボディ(diabody; Db)」は、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片を指す(P.Holliger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 6444–6448 (1993)、EP404,097号、WO93/11161号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で軽鎖可変領域(VL)及び重鎖可変領域(VH)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため単鎖V領域フラグメントを形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。このとき2つの異なるエピトープ(a, b)に対するVLとVHをVLa–VHbとVLb–VHaの組合せで5残基程度のリンカーで結んだものを同時に発現させると二重特異性Dbとして分泌される。このとき2つの異なるエピトープとは、同一の抗原上の異なる2箇所のエピトープであってもよく、また2つの異なる抗原のそれぞれにある2箇所のエピトープであってもよい。
- [0062] Diabodyは、2分子のscFvを含むことから、4つの可変領域を含み、その結果、2つの抗原結合部位を持つこととなる。ダイマーを形成させないscFvの場合と異なり、Diabodyの形成を目的とする場合、通常、各scFv分子内のVH及びVL間を結ぶリンカーは、ペプチドリンカーとする場合には、5アミノ酸前後のものとする。しかしながら、Diabodyを形成するscFvのリンカーは、scFvの発現を妨げず、Diabodyの形成を妨げない限り、このようなペプチドリンカーに限定されない。
- [0063] 本発明の方法に供される好ましいポリペプチドもしくは異種多量体としては、例えば、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を有するポリペプチドもしくは異種多量

体を挙げることができる。また、より好ましくは、本発明の好ましい態様においては、本発明のポリペプチドもしくは異種多量体が、2種以上の重鎖可変領域と、2種以上の軽鎖可変領域を含む際の、会合制御方法である。該ポリペプチドもしくは異種多量体は、2種以上のエピトープを認識するようなものが好ましく、例えば、多重特異性抗体を例示することができる。

- [0064] 本発明においてさらに好ましくは、多重特異性抗体として二重特異性抗体を挙げることができる。
- [0065] 即ち、本発明の好ましい態様においては、例えば、2種の重鎖可変領域(第一の重鎖と第二の重鎖)と、2種の軽鎖可変領域(第一の軽鎖と第二の軽鎖)から構成される二重特異性抗体について会合を制御する方法に関する。
- [0066] 本発明の好ましい態様の「二重特異性抗体」についてさらに詳述すれば、上記「第一の重鎖」とは抗体を形成する2つのH鎖のうちの一方のH鎖であり、第二のH鎖は第一のH鎖とは異なるもう一方のH鎖のことをいう。つまり、2つのH鎖のうち任意にどちらか一方を第一のH鎖とし、他方を第二のH鎖とすることができる。同様に、「第一の軽鎖」とは二重特異性抗体を形成する2つのL鎖のうちの一方のL鎖であり、第二のL鎖は第一のL鎖とは異なるもう一方のL鎖のことを指し、2つのL鎖のうちどちらか一方を任意に第一のL鎖とし、他方を第二のL鎖とすることができる。通常、第一のL鎖と第一のH鎖は或る抗原(又はエピトープ)を認識する同一の抗体より由来し、第二のL鎖と第二のH鎖も或る抗原(又はエピトープ)を認識する同一の抗体より由来する。ここで、第一のH鎖・L鎖で形成されるL鎖-H鎖対を第一の対、第二のH鎖・L鎖で形成されるL鎖-H鎖対を第二の対と呼ぶ。第二の対の由来となる抗体を作製する際に用いられる抗原(又はエピトープ)は、第一の対の由来となる抗体を作製する際に用いられるものとは異なっていることが好ましい。即ち、第一の対と第二の対が認識する抗原は同じでもよいが、好ましくは異なる抗原(又はエピトープ)を認識する。この場合、第一の対及び第二の対のH鎖とL鎖は互いに異なるアミノ酸配列を有していることが好ましい。第一の対と第二の対が異なるエピトープを認識する場合、該第一の対と第二の対は全く異なる抗原を認識してもよいし、同一抗原上の異なる部位(異なるエピトープ)を認識してもよい。又、一方がタンパク質、ペプチド、遺伝子、糖などの抗原を認識し

、他方が放射性物質、化学療法剤、細胞由来トキシン等の細胞傷害性物質などを認識してもよい。しかしながら、特定のH鎖とL鎖の組合せで形成される対を有する抗体を作製したいと考えた場合には、その特定のH鎖とL鎖を第一の対及び第二の対として任意に決定することができる。

なお、上記「二重特異性抗体」は、必ずしも、2種の重鎖および2種の軽鎖からなる抗体に限定されず、例えば、2種の重鎖可変領域および2種の軽鎖可変領域が1本鎖として連結した構造の抗体(例えば、sc(Fv)2)であってもよい。

[0067] 本発明の方法における変異導入前の抗体(本明細書においては、単に「本発明の抗体」と記載する場合あり)のH鎖又はL鎖をコードする遺伝子は既知の配列を用いることも可能であり、又、当業者に公知の方法で取得することもできる。例えば、抗体ライブラリーから取得することも可能であるし、モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマから抗体をコードする遺伝子をクローニングして取得することも可能である。

[0068] 抗体ライブラリーについては既に多くの抗体ライブラリーが公知になっており、又、抗体ライブラリーの作製方法も公知であるので、当業者は適宜抗体ライブラリー入手することが可能である。例えば、抗体ファージライブラリーについては、Clackson et al., Nature 1991, 352: 624-8、Marks et al., J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-97、Water houses et al., Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2265-6、Griffiths et al., EMBO J. 1994, 13: 3245-60、Vaughan et al., Nature Biotechnology 1996, 14: 309-14、及び特表平20-504970号公報等の文献を参照することができる。その他、真核細胞をライブラリーとする方法(WO95/15393号パンフレット)やリボソーム提示法等の公知の方法を用いることが可能である。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を元に適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、W

○95/15388を参考にすることができる。

- [0069] ハイブリドーマから抗体をコードする遺伝子を取得する方法は、基本的には公知技術を使用し、所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞(ハイブリドーマ)をスクリーニングし、得られたハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域(V領域)のcDNAを合成し、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結することにより得ることができる。
- [0070] より具体的には、特に以下の例示に限定される訳ではないが、上記のH鎖及びL鎖をコードする抗体遺伝子を得るための感作抗原は、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を示さないハプテン等を含む不完全抗原の両方を含む。例えば、目的タンパク質の全長タンパク質、又は部分ペプチドなどを用いることができる。その他、多糖類、核酸、脂質等から構成される物質が抗原となり得ることが知られており、本発明の抗体の抗原は特に限定されるものではない。抗原の調製は、当業者に公知の方法により行うことができ、例えば、バキュロウイルスを用いた方法(例えば、WO98/46777など)などに準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法(G. Kohler and C. Milstein, Methods Enzymol. 1981, 73: 3-46)等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。また、必要に応じ抗原を他の分子と結合させることにより可溶性抗原とすることもできる。受容体のような膜貫通分子を抗原として用いる場合、受容体の細胞外領域部分を断片として用いたり、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原として使用することも可能である。
- [0071] 抗体産生細胞は、上述の適当な感作抗原を用いて動物を免疫化することにより得ることができる。または、抗体を産生し得るリンパ球をin vitroで免疫化して抗体産生細胞とすることもできる。免疫化する動物としては、各種哺乳動物を使用できるが、ゲッ歯目、ウサギ目、靈長目の動物が一般的に用いられる。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒビ、チンパンジー等のサル等の靈長目の動物を例示することができる。その他、ヒト抗体遺伝子の

レパートリーを有するトランスジェニック動物も知られており、このような動物を使用することによりヒト抗体を得ることもできる(WO96/34096; Mendez et al., Nat. Genet. 1997, 15: 146–56参照)。このようなトランスジェニック動物の使用に代えて、例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させることにより、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878号公報参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる(WO93/12227、WO92/03918、WO94/02602、WO96/34096、WO96/33735参照)。

- [0072] 動物の免疫化は、例えば、感作抗原をPhosphate-Buffered Saline(PBS)または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じてアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。その後、好ましくは、フロント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4～21日毎に数回投与する。抗体の產生の確認は、動物の血清中の目的とする抗体力値を慣用の方法により測定することにより行われ得る。
- [0073] ハイブリドーマは、所望の抗原で免疫化した動物またはリンパ球より得られた抗体産生細胞を、慣用の融合剤(例えば、ポリエチレンギリコール)を使用してミエローマ細胞と融合して作成することができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, 59–103)。必要に応じハイブリドーマ細胞を培養・増殖し、免疫沈降、放射免疫分析(RIA)、酵素結合免疫吸着分析(ELISA)等の公知の分析法により該ハイブリドーマより產生される抗体の結合特異性を測定する。その後、必要に応じ、目的とする特異性、親和性または活性が測定された抗体を產生するハイブリドーマを限界希釈法等の手法によりサブクローニングすることもできる。
- [0074] 続いて、選択された抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)から、抗体に特異的に結合し得るプローブ(例えば、抗体定常領域をコードする配列に相補的なオリゴヌクレオチド等)を用いてクローニングすることができる。また、mRNAからRT-PCRによりクローニングすることも可能である。免疫グロブリンは、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つの異なるクラスに分類される。さらに、これらの

クラスは幾つかのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3、及びIgG-4; IgA-1及びIgA-2等)に分けられる。本発明において抗体の製造に使用するH鎖及びL鎖は、これらいずれのクラス及びサブクラスに属する抗体に由来するものであってもよく、特に限定されないが、IgGは特に好ましいものである。

[0075] ここで、H鎖及びL鎖をコードする遺伝子を遺伝子工学的手法により改変することも可能である。例えば、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ハムスター抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体等の抗体について、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体等を適宜作製することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体のH鎖、L鎖の可変領域とヒト抗体のH鎖、L鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementary determining region)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するようを作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(EP239400; WO96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(K. Sato et al., Cancer Res. 1993, 53: 851-856)。

[0076] 上述のヒト化以外に、例えば、抗原との結合性等の抗体の生物学的特性を改善するための改変を行うことも考えられる。このような改変は、部位特異的突然変異(例えば、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488参照)、PCR変異、カセット変異等の方法により行うことができる。一般に、生物学的特性の改善された抗体変異体は70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上(例えば、95%以上、97%、98%、99%等)のアミノ酸配列相同性及び/または類似性を元となった抗体の

可変領域のアミノ酸配列に対して有する。本明細書において、配列の相同性及び/または類似性は、配列相同性が最大の値を取るように必要に応じ配列を整列化、及びギャップ導入した後、元となった抗体残基と相同(同じ残基)または類似(一般的なアミノ酸の側鎖の特性に基き同じグループに分類されるアミノ酸残基)するアミノ酸残基の割合として定義される。通常、天然のアミノ酸残基は、その側鎖の性質に基づいて(1)疎水性:アラニン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、メチオニン及びロイシン;(2)中性親水性:アスパラギン、グルタミン、システイン、スレオニン及びセリン;(3)酸性:アスパラギン酸及びグルタミン酸;(4)塩基性:アルギニン、ヒスチジン及びリシン;(5)鎖の配向に影響する残基:グリシンおよびプロリン;ならびに(6)芳香族性:チロシン、トリプトファン及びフェニルアラニンのグループに分類される。

- [0077] 通常、H鎖及びL鎖の可変領域中に存在する全部で6つの相補性決定領域(超可変部;CDR)が相互作用し、抗体の抗原結合部位を形成している。このうち1つの可変領域であっても全結合部位を含むものよりは低い親和性となるものの、抗原を認識し、結合する能力があることが知られている。従って、本発明のH鎖及びL鎖をコードする抗体遺伝子は、該遺伝子によりコードされるポリペプチドが所望の抗原との結合性を維持していればよく、H鎖及びL鎖の各々の抗原結合部位を含む断片部分をコードしていればよい。
- [0078] 本発明の会合制御方法によって、上述のように、例えば、所望の二重特異性抗体を優先的(効率的)に取得することができる。即ち、モノマー混合物から所望の異種多量体である二重特異性抗体を効率的に形成させることができる。
- [0079] 以下、2種の重鎖可変領域(VH1とVH2)および2種の軽鎖可変領域(VL1とVL2)を有するIgG型二重特異性抗体の場合について、より詳細に説明するが、その他の異種多量体についても同様に本発明の方法を適用することができる。
- [0080] 第一の重鎖可変領域(VH1)と第一の軽鎖可変領域(VL1)により一方のエピトープを認識し、また、第二の重鎖可変領域(VH2)と第二の軽鎖可変領域(VL2)により他方のエピトープを認識するような二重特異性抗体を取得したい場合、該抗体の生産において4種のそれぞれの鎖を発現させると理論上10種類の抗体分子が生産される可能性がある。

[0081] この場合、例えば、VH1とVL2、および／またはVH2とVL1のポリペプチド間の会合を阻害するように制御すれば、所望の抗体分子を優先的に取得することが可能である。

一例を示せば、VH1のポリペプチドとVL2のポリペプチド間、および／または、VH2のポリペプチドとVL1のポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基を上述のように改変することにより、これらポリペプチド間の会合を阻害することが挙げられる。

[0082] また、本発明の会合制御の方法を利用することにより、重鎖同士(VH1とVH2)、あるいは、軽鎖同士(VL1とVL2)の会合を抑制させることも可能である。

[0083] 重鎖可変領域は、上述のように、通常3つのCDR領域とFR領域によって構成されている。本発明の好ましい態様において「改変」に供するアミノ酸残基としては、例えば、CDR領域あるいはFR領域に位置するアミノ酸残基の中から適宜選択することができる。一般的にCDR領域のアミノ酸残基の改変は、抗原に対する結合能を低下させる場合がある。従って、本発明において「改変」に供するアミノ酸残基としては、特に限定されるものではないが、FR領域に位置するアミノ酸残基の中から適宜選択することが好ましい。

[0084] 当業者であれば、本発明の方法によって会合を制御したい所望のポリペプチドについて、会合した際のFRの界面において接近するアミノ酸残基の種類を適宜知ることが可能である。

[0085] また、ヒトもしくはマウス等の生物において、抗体の可変領域のFRとして利用可能な配列を、当業者であれば、公共のデータベース等を利用して適宜取得することができる。より具体的には、後述の実施例に記載の手段にて、FR領域のアミノ酸配列情報を取り得することが可能である。

[0086] 例えば、後述の実施例に示す二重特異性抗体については、会合した際のFRの界面において接近するアミノ酸残基の具体例として、重鎖可変領域上の39位(FR2領域)(例えば、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における39位)のグルタミン(Q)と、相対(接触)する軽鎖可変領域上の38位(FR2領域)(例えば、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における44位)のグルタミン(Q)を挙げることができる。さらに、重鎖可変領域上の45位(FR2)(例えば、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における45位)のロイシン(L)

)と、相対する軽鎖可変領域上の44位(FR2)(例えば、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における50位)のプロリン(P)を好適に例示することができる。なお、これら部位のナンバーリングについては、Kabatらの文献(Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH)を参考にしている。

- [0087] 後述の実施例で示すように、これらアミノ酸残基を改変し、本発明の方法を実施することにより、所望の抗体を優先的に取得することができる。
- [0088] これらアミノ酸残基は、ヒトおよびマウスにおいて高度に保存されていることが知られている(J. Mol. Recognit. 2003; 16: 113–120)ことから、実施例に示す抗体以外のVHとVLの会合についても、上記アミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を改変することによって、抗体の可変領域の会合を制御することができる。
- [0089] 即ち好ましい態様において本発明は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体(ポリペプチド(例えば、sc(Fv)2)または異種多量体(例えば、IgG型抗体)等)であって、以下の(1)と(2)、または、(3)と(4)のアミノ酸残基が同種の電荷を有するアミノ酸残基である抗体を提供する。
- (1) 重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における39位に相当するアミノ酸残基
- (2) 軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基
- (3) 重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基
- (4) 軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における50位に相当するアミノ酸残基
- [0090] なお、上記の配列番号:6または8に記載のアミノ酸配列は、本発明において改変に供するアミノ酸残基の位置をより具体的に例示するためのものであり、重鎖可変領域または軽鎖可変領域が、これらのアミノ酸配列である場合に限定されない。
- [0091] 上記(1)と(2)、(3)と(4)に記載のそれぞれのアミノ酸残基は、後述の実施例および図1に示すように、会合した際に互いに接近している。当業者であれば、所望の重鎖可変領域または軽鎖可変領域について、市販のソフトウェアを用いたホモジーモ

デリング等により、上記(1)～(4)に記載のアミノ酸残基に対応する部位を見出すことができ、適宜、該部位のアミノ酸残基を改変に供することが可能である。

[0092] 上記抗体において、「電荷を有するアミノ酸残基」は、例えば、以下の(a)または(b)のいずれかの群に含まれるアミノ酸残基から選択されることが好ましい。

- (a) グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)；
- (b) リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)。

[0093] さらに本発明は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体(ポリペプチドまたは異種多量体等)であって、以下の(3)と(4)のいずれか一方が電荷を有するアミノ酸残基である抗体を提供する。以下の(3)と(4)で示すアミノ酸残基の側鎖は近接し、疎水性コアを形成し得る。

(3) 重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基

(4) 軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における50位に相当するアミノ酸残基

[0094] 上記抗体において、「電荷を有するアミノ酸残基」は、例えば、グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)、リジン(K)、アルギニン(R)またはヒスチジン(H)であることが好ましい。

[0095] 上記(1)～(4)に記載のアミノ酸残基は、通常、ヒトおよびマウスにおいてはそれぞれ(1)グルタミン(Q)、(2)グルタミン(Q)、(3)ロイシン(L)、(4)プロリン(P)である。従つて本発明の好ましい態様においては、これらアミノ酸残基を改変(例えば、電荷アミノ酸への置換)に供する。なお、上記(1)～(4)のアミノ酸残基の種類は、必ずしも上記のアミノ酸残基に限定されず、該アミノ酸に相当する他のアミノ酸であってもよい。例えば、軽鎖可変領域上の配列番号:8に記載のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸として、ヒトの場合、例えば、ヒスチジン(H)であってもよい。当業者においては、公知文献等(例えば、J. Mol. Recognit. 2003; 16: 113-120)を参照することにより、配列番号:8上の任意の位置について、その位置に相当するアミノ酸残基の種類を知ることが可能であり、適宜、該アミノ酸残基について改変(例えば、電荷アミノ酸へ置換)することができる。

- [0096] また、上述の抗体についての製造方法、および、上記(1)～(4)のアミノ酸残基を改変することを特徴とする本発明の会合制御方法もまた、本発明の好ましい態様である。
- [0097] また、本発明の別態様として、重鎖または軽鎖の定常領域の界面に電荷的な反発を導入して、重鎖同士または重鎖と軽鎖の会合を抑制させる方法が挙げられる。重鎖定常領域の界面で接触するアミノ酸残基としては、例えばCH3領域における377位(356位)と470位(439位)、378位(357位)と393位(370位)、427位(399位)と440位(409位)に相対する領域を挙げることができる。重鎖定常領域と軽鎖定常領域の界面で接触するアミノ酸残基としては、例えばCH1領域の221位(213位)とCL領域の123位の相対する領域を挙げができる。抗体定常領域のナンバーリングについては、Kabatらの文献(Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. N IH)を参考にし、重鎖定常領域についてはEUナンバーリングについて括弧内に表示した。
- [0098] 後述の実施例で示すように、これらアミノ酸残基を改変し、本発明の方法を実施することにより、抗体の重鎖の会合を制御し、所望の抗体を優先的に取得することができる。
- 即ち好ましい態様において本発明は、2種以上の重鎖CH3領域を含む抗体およびFc領域結合蛋白質(例えば、IgG型抗体、minibody(Alt M et al. FEBS Letters 1999; 454: 90-94)、イムノアドヘシン(非特許文献2)等)であって、第1の重鎖CH3領域における以下の(1)～(3)に示すアミノ酸残基の組から選択される1組ないし3組のアミノ酸残基が同種の電荷を有する抗体を提供する。
- (1) 重鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバーリングによる356位および439位のアミノ酸残基
- (2) 重鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバーリングによる357位および370位のアミノ酸残基
- (3) 重鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバーリングによる399位および409位のアミノ酸残基
- [0099] 更に好ましい態様において本発明は、上記第1の重鎖CH3領域とは異なる第2の

重鎖CH3領域における前記(1)～(3)に示すアミノ酸残基の組から選択されるアミノ酸残基の組であって、前記第1の重鎖CH3領域において同種の電荷を有する前記(1)～(3)に示すアミノ酸残基の組に対応する1組ないし3組のアミノ酸残基が、前記第1の重鎖CH3領域における対応するアミノ酸残基とは反対の電荷を有する抗体を提供する。

[0100] 上記(1)～(3)に記載のそれぞれのアミノ酸残基は、後述の実施例および図27に示すように、会合した際に互いに接近している。当業者であれば、所望の重鎖CH3領域または重鎖定常領域について、市販のソフトウェアを用いたホモロジーモデリング等により、上記(1)～(3)に記載のアミノ酸残基に対応する部位を見出すことができ、適宜、該部位のアミノ酸残基を改変に供することが可能である。

上記抗体において、「電荷を有するアミノ酸残基」は、例えば、以下の(a)または(b)のいずれかの群に含まれるアミノ酸残基から選択されることが好ましい。

- (a) グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)；
- (b) リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)。

[0101] 上記抗体において、「同種の電荷を有する」とは、例えば、2つ以上のアミノ酸残基のいずれもが、上記(a)または(b)のいずれか1の群に含まれるアミノ酸残基を有することを意味する。「反対の電荷を有する」とは、例えば、2つ以上のアミノ酸残基のなかの少なくとも1つのアミノ酸残基が、上記(a)または(b)のいずれか1の群に含まれるアミノ酸残基を有する場合に、残りのアミノ酸残基が異なる群に含まれるアミノ酸残基を有することを意味する。

好ましい態様において上記抗体は、第1の重鎖CH3領域と第2の重鎖CH3領域がジスルフィド結合により架橋されていてもよい。

本発明において「改変」に供するアミノ酸残基としては、上述した抗体の可変領域または抗体の定常領域のアミノ酸残基に限られない。当業者であれば、ポリペプチド変異体または異種多量体について、市販のソフトウェアを用いたホモロジーモデリング等により、界面を形成するアミノ酸残基を見出すことができ、会合を制御するように、該部位のアミノ酸残基を改変に供することが可能である。

[0102] 本発明の方法は、必須ではないが、公知の技術を組み合わせて実施することも可

能である。例えば、VH1とVL1、および／またはVH2とVL2の会合が促進されるように、本発明の「改変」に加えて、一方のH鎖の可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(knob; 突起)に置換し、もう一方のH鎖の相対する可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖(hole; 空隙)に置換することによって、突起が空隙に配置され得るようにしてVH1とVL1、および／またはVH2とVL2の会合を促進させ、結果的にVH1とVL2、および／またはVH2とVL1のポリペプチド間の会合をさらに抑制することが可能である。

- [0103] 本発明の会合制御方法は、所望のsc(Fv)2を優先的(効率的)に取得する際に、好適に実施することができる。以下、一例として、2種の重鎖可変領域(H1とH2)および2種の軽鎖可変領域(L1とL2)を有するsc(Fv)2の場合について、より詳細に説明する。
- [0104] 一般的にsc(Fv)2は、2つの重鎖可変領域(VH1とVH2)と2つの軽鎖可変領域(VL1とVL2)をリンカーで結合した一本鎖ポリペプチドである。即ち、sc(Fv)2は、4つの抗体可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である。通常、sc(Fv)2は2つの軽鎖可変領域と2つの重鎖可変領域の4つの可変領域をリンカーなどで結合して一本鎖にした抗体である(Hudson et al, J Immunol. Methods 1999;231:177–189)。
- [0105] sc(Fv)2は、当業者に公知の方法で作製することができ、例えば、scFvをリンカーで結ぶことによって作製できる。scFvには、抗体のVHおよびVLが含まれ、これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する(scFvの総説については、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol.113 (Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp.269–315, 1994)を参照)。
- [0106] また2つのVH及び2つのVLが、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点としてVH、VL、VH、VL([VH]リンカー[VL]リンカー[VH]リンカー[VL])の順に並んでいることを特徴とする抗体が好ましい。
- [0107] 2つのVHと2つのVLの順序は特に上記配置に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のよう、配置も挙げることができる。
- [VL]リンカー[VH]リンカー[VH]リンカー[VL]
- [VH]リンカー[VL]リンカー[VL]リンカー[VH]

[VH]リンカー[VH]リンカー[VL]リンカー[VL]

[VL]リンカー[VL]リンカー[VH]リンカー[VH]

[VL]リンカー[VH]リンカー[VL]リンカー[VH]

[0108] sc(Fv)2は抗体可変領域、リンカー以外のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

上記抗体の可変領域は、可変領域の全長でもよいが、抗原への結合活性を維持する限り可変領域の部分配列でもよい。又、可変領域中のアミノ酸配列を置換、欠失、付加、挿入などがされていてもよい。例えば、抗原性を低下させるために、キメラ化やヒト化されていてもよい。

[0109] 抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー(例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996参照)に開示されるリンカー等を用いることができるが、本発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、好ましい長さは12アミノ酸以上(上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下)であり、特に好ましくは15アミノ酸である。sc(Fv)2に3つのペプチドリンカーが含まれる場合には、全て同じ長さのペプチドリンカーを用いてもよいし、異なる長さのペプチドリンカーを用いてもよい。

[0110] 例えば、ペプチドリンカーの場合:

Ser

Gly•Ser

Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly

(Gly・Gly・Gly・Gly・Ser)<sub>n</sub>

(Ser・Gly・Gly・Gly・Gly)<sub>n</sub>

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。但し、ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

- [0111] 好ましいsc(Fv)2の態様としては、例えば、以下のsc(Fv)2を挙げることができる。
  - [VH]ペプチドリンカー(15アミノ酸)[VL]ペプチドリンカー(15アミノ酸)[VH]ペプチドリンカー(15アミノ酸)[VL]
- [0112] 合成化学物リンカー(化学架橋剤)は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、ジスクシンイミジルスペレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スペレート(BS<sup>3</sup>)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ-DST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)などであり、これらの架橋剤は市販されている。
- [0113] 4つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となるが、全て同じリンカーを用いてもよいし、異なるリンカーを用いてもよい。
 

また、sc(Fv)2における構造異性体として、例えば、single chain diabody型とbivalent scFv型が存在する。
- [0114] sc(Fv)2が、[可変領域1](リンカー1)[可変領域2](リンカー2)[可変領域3](リンカー3)[可変領域4]の順で並んでいる場合、本発明においてbivalent scFv型とは、可変領域1と可変領域2が会合し、かつ可変領域3と可変領域4が会合した状態の構造を有するsc(Fv)2をいう。本発明においてsingle chain diabody型とは可変領域1と可変領域4が会合し、かつ可変領域2と可変領域3が会合した状態の構造を有するsc(Fv)2のこと。

とをいう。

- [0115] single chain diabody型としては例えば図12(b)の右に記載の構造を有するsc(Fv)2であり、bivalent scFv型としては例えば図12(b)の左に記載の構造を有するsc(Fv)2である。
- [0116] sc(Fv)2がsingle chain diabody型またはbivalent scFv型のどちらの構造を有しているかは、例えば、プロテアーゼ限定分解法によって解析することが可能である。一例を示せば、以下のような方法によって解析することができる。
- [0117] sc(Fv)2のリンカー部分を部分的かつ限定期に分解できるプロテアーゼの一一種のsubtilisin Aを用いて、被検sc(Fv)2の限定分解を行う。
- [0118] single chain diabody型の場合は、VHとVLの間の相互作用によりsc(Fv)2が有する3つのリンカーのうち、どのリンカーに切断が起こった場合であっても、見かけの分子量には変化が見られない。
- [0119] 一方、bivalent scFv型の場合は、中央のリンカーに切断が起こった際に、半分の分子量の分子種が生成する。
- [0120] 従って、反応生成物を解析することにより、bivalent scFv型とsingle chain diabody型とを判別することが可能である。
- [0121] 反応生成物は、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィー分析によって、解析することができる。また、クロマトグラフィーを用いて、ピーク面積を基に、sc(Fv)2に含まれるbivalent sc(Fv)2構造とsingle chain diabody構造の存在比を定量的に評価することも可能である。
- 本発明の会合制御方法は、上記のsc(Fv)2について、所望の型、即ち、single chain diabody型とbivalent scFv型のどちらか一方を優先的に取得したい際に、好適に利用することができる。
- [0122] より具体的には、sc(Fv)2がVH1-(リンカー)-VL1-(リンカー)-VH2-(リンカー)-VL2の構造を有するとき、本発明の会合制御方法を用いて、bivalent scFv型のsc(Fv)2を優先的に取得したい場合には、例えば、VH1とVL2、および／または、VH2とVL1の会合を抑制させればよい。(一例を示せば、VH1とVL2の界面を形成するアミノ酸残基が同種の電荷となるように変異を導入する。)

[0123] また、single-chain diabody型のsc(Fv)2を優先的に取得したい場合には、例えば、VH1とVL1、および／または、VH2とVL2の会合を阻害させればよい。(一例を示せば、VH1とVL1の界面を形成するアミノ酸残基が同種の電荷となるように変異を導入する。)

また、sc(Fv)2が単特異性抗体(monospecific antibody)である場合にも、同様にして本発明を実施することが可能である。

また、これらの技術に加えて、VHとVLの各ドメインをジスルフィド結合により架橋されすることも可能である(Clin Cancer Res. 1996 Feb;2(2):245-52)。

[0124] 本発明の会合制御方法を利用することにより、例えば、活性を有する抗体もしくはポリペプチドを効率的に作成することができる。該活性としては、例えば、結合活性、中和活性、細胞傷害活性、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性、酵素活性等を挙げることができる。アゴニスト活性とは、受容体などの抗原に抗体が結合することにより、細胞内にシグナルが伝達される等して、何らかの生理的活性の変化を誘導する活性である。生理的活性としては、例えば、増殖活性、生存活性、分化活性、転写活性、膜輸送活性、結合活性、タンパク質分解活性、リン酸化／脱リン酸化活性、酸化還元活性、転移活性、核酸分解活性、脱水活性、細胞死誘導活性、アポトーシス誘導活性等を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0125] また本発明の方法によって、所望の抗原を認識する、または所望の受容体と結合する抗体もしくはポリペプチドを効率的に作成することができる。

[0126] 該抗原は特に限定されず、どのような抗原でもよい。抗原の例としては、例えば、受容体もしくはその断片、癌抗原、MHC抗原、分化抗原等を挙げることができるが、特にこれらに制限されない。

[0127] また、該受容体の例としては、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、Gタンパク質共役型受容体ファミリー、GPIアンカー型受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー、等の受容体ファミリーに属する受容体などを挙げることができる。これら受容体ファミリーに属する受容体、及びその特徴に関しては多数

の文献が存在し、例えば、Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. New Comprehensive Biochemistry Vol.18B "Hormones and their Actions Part II" pp.1–46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA、Patthy L. (1990) Cell, 61: 13–14.、Ullrich A., et al. (1990) Cell, 61: 203–212.、Massagué J. (1992) Cell, 69: 1067–1070.、Miyajima A., et al. (1992) Annu. Rev. Immunol., 10: 295–331.、Taga T. and Kishimoto T. (1992) FASEB J., 7: 3387–3396.、Fantl WI., et al. (1993) Annu. Rev. Biocomput., 62: 453–481.、Smith CA., et al. (1994) Cell, 76: 959–962.、Flower DR. (1999) Biochim. Biophys. Acta, 1422: 207–234.、宮坂昌之監修、細胞工学別冊ハンドブックシリーズ「接着因子ハンドブック」(1994) (秀潤社、東京、日本) 等が挙げられる。上記受容体ファミリーに属する具体的な受容体としては、例えば、ヒト又はマウスエリスロポエチン(EPO)受容体、ヒト又はマウス顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体、ヒト又はマウストロンボポイエチン(TPO)受容体、ヒト又はマウスインスリン受容体、ヒト又はマウスFlt-3リガンド受容体、ヒト又はマウス血小板由来増殖因子(PDGF)受容体、ヒト又はマウスインターフェロン(IFN)- $\alpha$ 、 $\beta$ 受容体、ヒト又はマウスレプチニン受容体、ヒト又はマウス成長ホルモン(GH)受容体、ヒト又はマウスインターロイキン(IL)-10受容体、ヒト又はマウスインスリン様増殖因子(IGF)-I受容体、ヒト又はマウス白血病抑制因子(LIF)受容体、ヒト又はマウス毛様体神経栄養因子(CNTF)受容体等を例示することができる(hEPOR: Simon, S. et al. (1990) Blood 76, 31–35.; mEPOR: D'Andrea, AD. Et al. (1989) Cell 57, 277–285.; hG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 8702–8706.; mG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) Cell 61, 341–350.; hTPOR: Vigon, I. et al. (1992) 89, 5640–5644.; mTPOR: Skoda, RC. Et al. (1993) 12, 2645–2653.; hInsR: Ullrich, A. et al. (1985) Nature 313, 756–761.; hFlt-3: Small, D. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 459–463.; hPDGFR: Gronwald, RGK. Et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 3435–3439.; hIFN  $\alpha$ / $\beta$  R: Uze, G. et al. (1990) Cell 60, 225–234.及びNovick, D. et al. (1994) Cell 77, 391–400.)。

[0128] 癌抗原は細胞の悪性化に伴って発現する抗原であり、腫瘍特異性抗原とも呼ばれる。又、細胞が癌化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖も癌

抗原となり、特に癌糖鎖抗原と呼ばれる。癌抗原の例としては、例えば、CA19-9、CA15-3、シリアルSSEA-1(SLEX)などを挙げることができる。

- [0129] MHC抗原には、MHC class I抗原とMHC class II抗原に大別され、MHC class I抗原には、HLA-A,-B,-C,-E,-F,-G,-Hが含まれ、MHC class II抗原には、HLA-DR,-DQ,-DPが含まれる。
- [0130] 分化抗原には、CD1,CD2,CD3,CD4,CD5,CD6,CD7,CD8,CD10,CD11a,CD11b,C D11c,CD13,CD14,CD15s,CD16,CD18,CD19,CD20,CD21,CD23,CD25,CD28,CD29 ,CD30,CD32,CD33,CD34,CD35,CD38,CD40,CD41a,CD41b,CD42a,CD42b,CD43, CD44,CD45,CD45RO,CD48,CD49a,CD49b,CD49c,CD49d,CD49e,CD49f,CD51,C D54,CD55,CD56,CD57,CD58,CD61,CD62E,CD62L,CD62P,CD64,CD69,CD71,CD 73,CD95,CD102,CD106,CD122,CD126,CDw130などが含まれる。
- [0131] また本発明は、本発明の方法によって会合が制御されたポリペプチド変異体もしくは異種多量体を提供する。即ち本発明は、本発明の会合制御方法によって取得されるポリペプチド、または異種多量体に関する。
- [0132] 本発明の好ましい態様においては、ポリペプチド変異体であって、元のポリペプチド内の会合が阻害されるように、該ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基の改変を有するポリペプチド変異体を提供する。
- [0133] また本発明の別の態様においては、異種多量体であって、元のポリペプチド間の会合が阻害されるように、該ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基の改変を有する異種多量体を提供する。
- [0134] 本発明において「元のポリペプチド」とは、本発明の方法によって会合が制御されるように改変される前の状態のポリペプチドを言う。
- [0135] 本発明の上記ポリペプチド変異体の一例としては、元のポリペプチドが2種の構造異性体を形成し得る変異体を挙げることができる。また、上記異種多量体の一例としては、元のポリペプチドが2種以上の多量体を形成し得る多量体を挙げができる。
- [0136] また、本発明の上述の会合制御方法によって、会合が制御されたポリペプチド変異体もしくは異種多量体もまた、本発明に含まれる。即ち、上述の会合制御方法の好ま

しい態様において、会合が制御されたポリペプチドもしくは異種多量体もまた、本発明の好ましい態様の一つである。

- [0137] また本発明は、ポリペプチドまたは多種多量体の会合が制御されたポリペプチドまたは多種多量体の製造方法を提供する。
- [0138] 本発明の製造方法の好ましい態様としては、ポリペプチドの会合が制御されるよう にポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基に変異を有するポリペプチドの製造 方法であって、(a)ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を 、ポリペプチド内の会合が阻害されるように元の核酸から改変し、(b)宿主細胞を該 核酸が発現するように培養し、(c)宿主細胞培養物から該ポリペプチドを回収するこ とを含むポリペプチド変異体の製造方法を提供する。
- [0139] また、本発明の製造方法の別の態様においては、異種多量体の会合が制御される ようにポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基に変異を有する異種多量体の製 造方法であって、(a)ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸 を、ポリペプチド間の会合が阻害されるように元の核酸から改変し、(b)宿主細胞を 該核酸が発現するように培養し、(c)宿主細胞培養物から該異種多量体を回収する ことを含む異種多量体の製造方法を提供する。
- [0140] また、本発明の上述の会合制御方法を利用して、ポリペプチドの会合が阻害される ように、ポリペプチド内(間)の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を、元の 核酸から改変する工程を含む方法もまた、本発明の上記製造方法の好ましい態様の 一つである。
- [0141] 本発明の上記方法において「核酸を改変する」とは、本発明における「改変」によつ て導入されるアミノ酸残基に対応するように核酸を改変することを言う。より具体的には、元(改変前)のアミノ酸残基をコードする核酸について、改変によって導入される アミノ酸残基をコードする核酸へ改変することを言う。通常、目的のアミノ酸残基をコ ードするコドンとなるように、元の核酸に対して、少なくとも1塩基を挿入、欠失または 置換するような遺伝子操作もしくは変異処理を行うことを意味する。即ち、元のアミノ 酸残基をコードするコドンは、改変によって導入されるアミノ酸残基をコードするコドン によって置換される。このような核酸の改変は、当業者においては公知の技術、例え

ば、部位特異的変異誘発法、PCR変異導入法等を用いて、適宜実施することが可能である。

- [0142] また、本発明における核酸は、通常、適当なベクターへ担持(挿入)され、宿主細胞へ導入される。該ベクターとしては、挿入した核酸を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製)などが好ましいが、市販の種々のベクターを利用することができる。本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター(プロメガ社製)、大腸菌であればpETベクター(Invitrogen社製)、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター(GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であればpME18Sベクター(Mol Cell Biol. 8:466-472(1988))などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。
- [0143] 上記宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ポリペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞(例:ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞(例:酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞(例:ドロソフィラS2、スポドプテラSF9)、動物細胞(例:CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞)および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。
- [0144] 宿主細胞において発現したポリペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であ

つても、異種シグナルであってもよい。

- [0145] 上記製造方法におけるポリペプチドの回収は、本発明のポリペプチドが培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のポリペプチドが細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にポリペプチドを回収する。
- [0146] 組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。
- [0147] また本発明は、本発明のポリペプチド変異体または本発明の異種多量体、および医薬的に許容される担体を含む組成物(薬剤)に関する。
- [0148] 本発明において医薬組成物とは、通常、疾患の治療もしくは予防、あるいは検査・診断のための薬剤を言う。
- [0149] 本発明の医薬組成物は、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように設定する。
- [0150] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。
- [0151] 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬(例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム)を含む等張液が挙げられる。適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレン glycole、ポリエチレン glycole等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80(TM)、HCO-50等)を併用してもよい。

- [0152] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び／またはベンジルアルコールを併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩酸プロカイン)、安定剤(例えば、ベンジルアルコール及びフェノール)、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填する。
- [0153] 本発明の医薬組成物は、好ましくは非経口投与により投与される。例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型の組成物とすることができる。例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。
- [0154] 投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。抗体または抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の投与量は、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲に設定することができる。または、例えば、患者あたり0.001～100000mgの投与量とすることもできるが、本発明はこれらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量及び投与方法は、患者の体重、年齢、症状などにより変動するが、当業者であればそれらの条件を考慮し適当な投与量及び投与方法を設定することができる。
- [0155] また、必要に応じ本発明のポリペプチドもしくは異種多量体を、その他の医薬成分と組み合わせて製剤化することもできる。
- [0156] また本発明は、本発明のポリペプチド変異体または本発明の異種多量体をコードする核酸を提供する。さらに該核酸を担持するベクターもまた、本発明に含まれる。
- [0157] さらに本発明は、上記核酸を有する宿主細胞を提供する。該宿主細胞は、特に制限されず、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを挙げることができる。宿主細胞は、例えば、本発明の抗体もしくはポリペプチドの製造や発現のための產生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための產生系には、in vitroおよびin vivoの產生系がある。in vitroの產生系としては、真核細胞を使用する產生系及び原核細胞を使用する產生系が挙げられる。
- [0158] 宿主細胞として使用できる真核細胞として、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞が挙げられる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995

) 108: 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero等、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle et al., Nature (1981) 291: 338-340)、及び昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が例示される。本発明の抗体の発現においては、CHO-DG44、CHO-DX11B、COS7細胞、BHK細胞が好適に用いられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (Boehringer Mannheim製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

- [0159] 植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が蛋白質生産系として知られており、この細胞をカルス培養する方法により本発明の抗体を產生させることができる。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属の細胞 (サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*) 等)、及び糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属の細胞 (アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 等) を用いた蛋白質発現系が公知であり、本発明の抗体產生の宿主として利用できる。
- [0160] 原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、上述の大腸菌 (*E. coli*) に加えて、枯草菌を用いた產生系が知られており、本発明の抗体產生に利用できる。
- [0161] 本発明の宿主細胞を用いて抗体を產生する場合、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターにより形質転換された宿主細胞の培養を行い、ポリヌクレオチドを発現させればよい。培養は、公知の方法に従って行うことができる。例えば、動物細胞を宿主とした場合、培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、FBS、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用しても、無血清培養により細胞を培養してもよい。培養時のpHは、約6~8とするのが好ましい。培養は、通常、約30~40°Cで約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。
- [0162] 一方、*in vivo*でポリペプチドを產生させる系としては、例えば、動物を使用する產生系や植物を使用する產生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするポリ

ヌクレオチドを導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。

本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

- [0163] 動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる產生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシ等を用いることができる(Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993))。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。
- [0164] 例えば、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むポリヌクレオチド断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生される抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに投与してもよい(Ebert et al., Bio/Technology (1994) 12: 699–702)。
- [0165] また、本発明の抗体を産生させる昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の抗体をコードするポリヌクレオチドを挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的の抗体を得ることができる(Susumu et al., Nature (1985) 315: 592–4)。
- [0166] さらに、植物を本発明の抗体産生に使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする抗体をコードするポリヌクレオチドを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム(*Nicotiana tabacum*)に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得ることができる(Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 131–8)。
- [0167] このようにして得られた抗体は、宿主細胞内または細胞外(培地、乳汁など)から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過

、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせて抗体を分離、精製することができる。

[0168] クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al.(1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティクロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia製)等が挙げられる。

[0169] 必要に応じ、抗体の精製前又は精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

[0170] 上述のように本発明の宿主細胞を培養し、該細胞培養物からポリペプチドを回収する工程を含む、本発明のポリペプチド変異体もしくは異種多量体の製造方法もまた、本発明の好ましい態様の一つである。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0171] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0172] [実施例1] Factor IXa(F. IXa)に対する非中和抗体の作製

### 1-1. 免疫およびハイブリドーマ作製

BALB/cマウス(雄、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー)8匹およびMRL/lprマウス(雄、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー)5匹に、Factor IXa β(Enzy

me Research Laboratories, Inc. )を以下の通り免疫した。初回免疫としてFCA(フロイント完全アジュバントH37 Ra (Difco laboratories))でエマルジョン化したFactor IXa  $\beta$  を $40 \mu\text{g}/\text{head}$ 皮下投与した。2週間後にFIA(フロイント不完全アジュバント(Difco laboratories))でエマルジョン化したFactor IXa  $\beta$  を $40 \mu\text{g}/\text{head}$ 皮下投与した。以後1週間間隔で追加免疫を3~7回行った。Factor IXa  $\beta$  に対する血清抗体価の上昇を1~2に示したELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)で確認後、最終免疫としてPBS(-)(カルシウムイオン、マグネシウムイオンを含まないphosphate buffered saline)に希釈したFactor IXa  $\beta$  を $40 \mu\text{g}/\text{head}$ 静脈内投与した。最終免疫の3日後、マウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞P3X63Ag8U. 1 (P3U1と称す、ATCC CRL-1597)を、PEG1500(ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いた常法に従い細胞融合した。10%FBS(*In vitro*)を含むRPMI1640培地(Invitrogen)(以下、10%FBS/RPMI1640と称す)に懸濁した融合細胞を96 well culture plateに播種し、融合1, 2, 3, 5日後にHAT選択培地(10%FBS/RPMI1640 / 2%HAT 50x concentrate(大日本製薬) / 5% BM-Condimed H1(ロシュ・ダイアグノスティックス))への置換を行うことにより、ハイブリドーマの選択培養を行った。融合後8日目または9日目に採取した培養上清を用いて、1~2に示したELISAによりFactor IXaに対する結合活性を測定することにより、Factor IXa結合活性を有するハイブリドーマを選択した。続いて5~3に示した方法でFactor IXaの酵素活性に対する中和活性を測定し、Factor IXaに対する中和活性を有さないハイブリドーマを選択した。ハイブリドーマは、96 well culture plateに1 wellあたり1個の細胞を播種することによる限界希釈を2回行ってクローン化し、抗Factor IXa抗体を産生するハイブリドーマXB12を樹立した。

[0173] 1~2. Factor IXa ELISA

Coating buffer(100mM sodium bicarbonate, pH 9.6, 0.02% sodium azide)で $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したFactor IXa  $\beta$  を、Nunc-Immuno plate (Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ plates MaxiSorp™ (Nalge Nunc International))に $100 \mu\text{L}/\text{well}$ で分注後、4°Cで一晩インキュベーションした。Tween<sup>(R)</sup> 20を含むPBS(-)で3回洗浄後、diluent buffer (50mM Tris-HCl, pH8.1, 1% bovine serum albumin, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15M NaCl, 0.05% Tween<sup>(R)</sup> 20, 0.02% sodium azide)でplateを室温で2時間blockingした。Bufferを除去後、plate

にdiluent bufferで希釈したマウスの抗血清またはハイブリドーマの培養上清を100  $\mu$  L/well添加し、室温で1時間インキュベーションした。Plateを3回洗浄後、diluent bufferで1/2000希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG (H+L) (Zymed Laboratories)を100  $\mu$  L/well添加し、室温で1時間インキュベーションした。Plateを6回洗浄後、発色基質Blue-Phos<sup>TM</sup> Phosphate Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories)を100  $\mu$  L/well添加し、室温で20分インキュベーションした。Blue-Phos<sup>TM</sup> Stop Solution (Kirkegaard & Perry Laboratories)を100  $\mu$  L/well添加した後、595nmにおける吸光度をMicroplate Reader Model 3550 (Bio-Rad Laboratories)で測定した。

[0174] 1-3. Factor IXa中和活性測定

Phospholipid (Sigma-Aldrich)を注射用蒸留水で溶解し、超音波処理を施すことにより、400  $\mu$  g/mLのphospholipid溶液を調製した。0.1%ウシ血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩液(以下、TBSB)40  $\mu$  Lと30ng/mL Factor IXa  $\beta$  (Enzyme Research Laboratories) 10  $\mu$  Lと400  $\mu$  g/mL phospholipid溶液5  $\mu$  Lと100 mM CaCl<sub>2</sub>、20 mM MgCl<sub>2</sub>を含むTBSB 5  $\mu$  Lとハイブリドーマ培養上清10  $\mu$  Lを96穴プレート中で混和し、室温で1時間インキュベーションした。この混合溶液に、50  $\mu$  g/mL Factor X (Enzyme Research Laboratories) 20  $\mu$  Lおよび3U/mL Factor VIIIa (Amrican diagnostica) 10  $\mu$  Lを加え、室温で30分間反応させた。これに10  $\mu$  Lの0.5M EDTAを添加することにより反応を停止させた。この反応溶液に、50  $\mu$  LのS-2222溶液 (Chromogenix)を添加し、室温で30分間インキュベーションした後、測定波長405nm、対照波長655nmにおける吸光度をMicroplate Reader Model 3550 (Bio-Rad Laboratories, Inc. )により測定した。

[0175] [実施例2] Factor X(F. X)に対する非中和抗体の作製

2-1. 免疫およびハイブリドーマ作製

BALB/cマウス(雄、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー)8匹およびMRL/lprマウス(雄、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー)5匹に、Factor X (Enzyme Research Laboratories)を以下の通り免疫した。初回免疫としてFCAでエマルジョン化したFactor Xを40  $\mu$  g/head皮下投与した。2週間後にFIAでエマルジョン化したFactor Xを20または40  $\mu$  g/head皮下投与した。以後1週間間隔で追加免疫を合計3~6回行った。Factor Xに対する血清抗体価の上昇を2-2に示したELISAで確認後、最終

免疫としてPBS(−)に希釈したFactor Xを20または40 μg/head静脈内投与した。最終免疫の3日後、マウスの脾臓細胞とマウスマイエローマ細胞P3U1を、PEG1500を用いた常法に従い細胞融合した。10%FBS/RPMI1640培地に懸濁した融合細胞を96 well culture plateに播種し、融合1, 2, 3, 5日後にHAT選択培地への置換を行うことにより、ハイブリドーマの選択培養を行った。融合後8日目に採取した培養上清を用いて2-2に示したELISAによりFactor Xに対する結合活性を測定した。Factor X結合活性を有するハイブリドーマを選択し、2-3に示した方法でFactor Xaの酵素活性に対する中和活性を測定した。Factor Xaに対する中和活性を有さないハイブリドーマを、限界希釈を2回行うことによりクローニングし、抗Factor X抗体を産生するハイブリドーマSB04を樹立した。

[0176] 2-2. Factor X ELISA

Coating bufferで1 μg/mLに希釈したFactor Xを、Nunc-Immuno plateに100 μL/wellで分注後、4°Cで一晩インキュベーションした。Tween<sup>(R)</sup> 20を含むPBS(−)で3回洗浄後、diluent bufferでplateを室温で2時間blockingした。Bufferを除去後、plateにdiluent bufferで希釈したマウスの抗血清またはハイブリドーマの培養上清を添加し、室温で1時間インキュベーションした。Plateを3回洗浄後、diluent bufferで1/2000希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG (H+L)を添加し、室温で1時間インキュベーションした。Plateを6回洗浄後、発色基質Blue-Phos<sup>TM</sup> Phosphate Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories)を100 μL/well添加し、室温で20分インキュベーションした。Blue-Phos<sup>TM</sup> Stop Solution (Kirkegaard & Perry Laboratories)を100 μL/well添加した後、595nmにおける吸光度をMicroplate Reader Model 3550 (Bio-Rad Laboratories)で測定した。

[0177] 2-3. Factor Xa中和活性測定

TBSBで1/5希釈したハイブリドーマ培養上清10 μLと40 μLの250 pg/mL Factor Xa (Enzyme Research Laboratories)を含むTBCP(2.78 mM CaCl<sub>2</sub>, 22.2 μMリン脂質(フォスファチジルコリン:フォスファチジルセリン=75:25、Sigma-Aldrich)を含むTBSB)を混和し、室温で1時間インキュベーションした。この混合溶液に、20 μg/mLプロトロンビン(Enzyme Research Laboratories)および100 ng/mL活性化凝固第V因子(Fact

or Va(Haematologic Technologies))を含むTBCPを50 μL添加して室温で10分間反応させた。0.5 M EDTAを10 μL添加することにより反応を停止させた。この反応溶液に、1 mM S-2238溶液(Chromogenix)を50 μL添加し、室温で30分間インキュベーションした後、405 nmにおける吸光度をMicroplate Reader Model 3550(Bio-Rad Laboratories)で測定した。

[0178] [実施例3] キメラ二重特異性抗体発現ベクターの構築

3-1. ハイブリドーマからの抗体可変領域をコードするDNA断片の調製

抗F. IXa抗体を産生するハイブリドーマXB12あるいは抗F. X抗体を産生するハイブリドーマSB04から、QIAGEN<sup>(R)</sup> RNeasy<sup>(R)</sup> Mini Kit (QIAGEN)を用いて説明書記載の方法に従い全RNAを抽出した。全RNAを40 μLの滅菌水に溶解した。精製されたRNA1~2 μgを鋸型に、SuperScript cDNA合成システム(Invitrogen)を用いて説明書記載の方法に従いRT-PCR法により一本鎖cDNAを合成した。

[0179] 3-2. 抗体H鎖可変領域のPCRによる增幅と配列解析

マウス抗体H鎖可変領域(VH)cDNAの増幅用プライマーとして、Krebberらの報告(J. Immunol. Methods 1997;201:35–55)に記載のHBプライマー混合物、およびHFプライマー混合物を用意した。各0.5 μLの100 μM HB プライマー混合物および100 μM HFプライマー混合物を用いて、反応液25 μL(3-1で調製したcDNA溶液2.5 μl、KOD plus buffer(東洋紡績)、0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 units DNA polymerase KOD plus(東洋紡績))を調製した。PCRは、サーマルサイクルGeneAmp PCR system 9700(Parkin Elmer)を用いて、cDNA断片の増幅の効率性に応じて、条件A(98°Cで3分間加熱後、98°C 20秒、58°C 20秒、72°C 30秒からなる反応を1サイクルとして32サイクル)ないし条件B(94°Cで3分間加熱後、94°C 20秒、46°C 20秒、68°C 30秒からなる反応を1サイクルとして5サイクル、さらに94°C 20秒、58°C 20秒、72°C 30秒からなる反応を1サイクルとして30サイクル)のいずれかの条件で行った。PCR後、反応液を1%アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400bp)の増幅断片をQIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用い、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μLで溶出した。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用い、DNAシーケンサーABI PRISM 3100 Ge

netic Analyzer (Applied Biosystems) にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。本方法により決定した配列群を解析ソフトGENETYX-SV/RC Version 6. 1 (Genetyx) にて比較解析し、異なる配列を有するものを選択した。

[0180] 3-3. クローニング用抗体可変領域DNA断片の調製

クローニング用制限酵素Sfi I切断サイトを抗体可変領域増幅断片の両末端へ付加するために、以下の操作を行った。

Sfi I切断部位付加VH断片 (Sfi I-VH) 増幅のために、プライマーHBの (Gly4Ser)2-リンカ一配列をSfi I切断部位を有するに示す配列へ変更したもの(プライマー VH-5' end)を用意した。各0.5  $\mu$  lの10  $\mu$  M 配列特異的プライマーVH-5' endおよび 10  $\mu$  M プライマースcfor (J. Immunol. Methods 1997; 201: 35-55)を用いて、反応液20  $\mu$  L(3-2で調製した精製VH cDNA増幅断片溶液1  $\mu$  l, KOD plus buffer(東洋紡績)、0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 units DNA polymerase KOD plus(東洋紡績))を調製した。PCRは、サーマルサイクラーGeneAmp PCR system 9700 (Parkin Elmer)を用いて、断片の増幅の効率性に従い、条件A(98°Cで3分間加熱後、98°C 20秒、58°C 20秒、72°C 30秒からなる反応を1サイクルとして32サイクル)ないし条件B(94°Cで3分間加熱後、94°C 20秒、46°C 20秒、68°C 30秒からなる反応を1サイクルとして5サイクル、さらに94°C 20秒、58°C 20秒、72°C 30秒からなる反応を1サイクルとして30サイクル)のいずれかの条件で行った。PCR後、反応液を1% アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400bp)の増幅断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) にて添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30  $\mu$  Lで溶出した。

[0181] マウス抗体L鎖可変領域(VL) cDNA断片増幅のために、まずKrebberらの報告 (J. Immunol. Methods 1997; 201: 35-55) 記載の各0.5  $\mu$  Lの100  $\mu$  M LBプライマー混合物および 100  $\mu$  M LFプライマー混合物を用いて、反応液 25  $\mu$  L(3-1で調製したc-DNA溶液2.5  $\mu$  L, KOD plus buffer(東洋紡績)、0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 units DNA polymerase KOD plus(東洋紡績))を調製した。PCRは、サーマルサイクラーGeneAmp PCR system 9700 (Parkin Elmer)を用いて、断片の増幅の効率性に従い、94°Cで3分間加熱後、94°C 20秒、46°C 20秒、68°C 30秒からなる反応を1サイクルとして5サイクル、さらに94°C 20秒、58°C 20秒、72°C 30秒からなる反応を1サイクル

として30サイクルの条件で行った。PCR後、反応液を1% アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400bp)の増幅断片をQIAquick Gel Extractio Kit (QIAGEN)にて添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μLで溶出した。該断片はそのC末端にプライマーLF由来の (Gly4Ser)3- リンカー配列が付加された状態にある。該断片C末端へSfi I切断部位を付加する目的で、プライマーLFの (Gly4Ser)3- リンカー配列をSfi I切断部位を有するに示す配列へ変更したもの(プライマー VL-3' end)を用意した。Sfi I 切断部位付加VL断片 (Sfi I-VL) 増幅のために、各0.5 μLの10 μM VL-3' endプライマー混合物および 10 μM scbackプライマーを用いて、反応液 20 μL (精製VL cDNA増幅断片溶液1 μL, KOD plus buffer(東洋紡績)、0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 units DNA polymerase KOD plus(東洋紡績))を調製した。PCRは、サーマルサイクラーGeneAmp PCR system 9700 (Parkin Elmer)を用いて、94°Cで3分間加熱後、94°C 20秒、46°C 20秒、68°C 30秒からなる反応を1サイクルとして5サイクル、さらに94°C 20秒、58°C 20秒、72°C 30秒からなる反応を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。PCR後、反応液を1% アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400bp)の増幅断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用い、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μLで溶出した。

[0182] 精製Sfi I-VHおよびSfi I-VL断片はSfi I(タカラバイオ)にて添付説明書記載の方法に従い反応液を調製し、50°Cで一晩消化を行った。その後、反応液をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて添付説明書記載の方法で精製し、該キット添付のBuffer EB 30 μLで溶出した。

[0183] 3-4. ヒトIgG4-マウスキメラ二重特異性IgG抗体発現用プラスミド

目的の二重特異性IgG抗体を產生する際に、各H鎖のヘテロ分子を形成させるためにIgG1のknobs-into-holes技術(非特許文献3)を参考にIgG4のCH3部分へのアミノ酸置換体を作製した。タイプa(IgG4 γ a)はY349C、T366W置換体であり、タイプb(IgG4 γ b)はE356C、T366S、L368A、Y407Vの置換体である。さらに、両置換体のヒジ領域にも置換(-ppcpScp-- > -ppcpPcp-)を導入した。本技術により、殆どヘテロ体となり得るが、L鎖についてはその限りでなく、不必要的抗体分子の生成がその後の活性測定へ影響を及ぼしかねない。そのため、本方策では各特異性を有する抗

体分子片腕(HL分子と称する)を別々に発現させ細胞内で目的型二重特異性IgG抗体を効率的に作らせる為に各HL分子に対応する発現ベクターとして異なる薬剤で誘導がかかるものを用いた。

- [0184] 抗体分子片腕(便宜上右腕HL分子と称する)の発現用として、テトラサイクリン誘導型ベクター pcDNA4 (Invitrogen) へH鎖ないしL鎖それぞれの該領域、すなわち動物細胞用シグナル配列(IL3ss) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81: 1075) の下流に適当なマウス抗体可変領域(VHないしVL)とヒトIgG4  $\gamma$  a定常領域(配列番号:9)ないし $\kappa$ 定常領域(配列番号:10)を組み込んだもの(pcDNA4-g4HないしpcDNA4-g4L)を作製した。まず、pcDNA4をそのマルチクローニングサイトに存在する制限酵素切断サイトEco RVおよびNot I(タカラバイオ)で消化した。適当な抗体可変領域を有するキメラ二重特異性抗体右腕H鎖ないしL鎖発現ユニット(それぞれ約1.6kbないし約1.0kb)をXho I(タカラバイオ)で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)にて添付説明書記載の方法で精製し、DNA polymerase KOD(東洋紡績)を用いて添付説明書記載の反応液組成にて72°C10分間反応させ、末端を平滑化した。該平滑化末端断片をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)にて添付説明書記載の方法で精製し、Not I(タカラバイオ)で消化した。該Not I-blunt断片(それぞれ約1.6kbないし1.0kb)と該Eco RV-Not Iで消化したpcDNA4を、Ligation High(東洋紡績)を用いて添付説明書記載の方法に従い連結反応を行った。該反応液により大腸菌DH5  $\alpha$  株(Competent high DH5  $\alpha$  (東洋紡績))を形質転換した。得られたアンピシリン耐性クローンよりQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて各々プラスミドDNAを単離した。
- [0185] もう一方の片腕(便宜上左腕HL分子と称する)はエクダイソン類似体誘導型ベクター pIND (Invitrogen) へH鎖ないしL鎖それぞれの該領域、すなわち動物細胞用シグナル配列(IL3ss) (EMBO. J. 1987; 6: 2939) の下流に適当なマウス抗体可変領域(VHないしVL)とヒトIgG4  $\gamma$  b定常領域(配列番号:11)ないし $\kappa$ 定常領域を組み込んだもの(pIND-g4Hないし pIND-g4L)を前述の方法に則り作製し、各々のプラスミドDNAを単離した。
- [0186] 3-5. 二重特異性抗体発現ベクター構築

3-4で調製されたテトラサイクリン誘導型発現プラスミド(pcDNA4-g4HないしpcDNA4-g4L)をSfi Iで消化し、反応液を1%アガローズゲル電気泳動に供した。もともと有していた抗体可変領域部分(VHないしVL)が除かれた断片(約5kb)をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用い、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μLで溶出した。該断片と、それぞれに対応する3-3で調製されたSfi I消化抗F. IXa抗体XB12由来Sfi I-VHないしSfi I-VL断片をQuick Ligation Kit (New England Biolabs)を用いて添付説明書記載の方法に従い連結反応を行った。該反応液により大腸菌DH $5\alpha$ 株(Competent high DH5 $\alpha$ (東洋紡績))を形質転換した。また、3-4で調製されたSfi I消化エクダイソン類似体誘導型発現プラスミド(pIND-g4HないしpIND-g4L)から、上述と同様の手法で抗体可変領域部分(VHないしVL)を除いた断片と、それぞれに対応する3-3で調製されたSfi I消化抗F. X抗体SB04由来Sfi I-VHないしSfi I-VL断片を、同様の手法にて組込んだ。

[0187] 各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、DNAシーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて添付説明書記載の方法に従い決定した。本方法により決定した配列群を解析ソフトGENETYX-SV/RC Version 6. 1 (Genetyx)にて解析した。

[0188] 該目的クローンから、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて各々プラスミドDNAを単離し、100 μLの滅菌水へ溶解した。抗F. IXa抗体キメラH鎖発現ベクター、抗F. IXa抗体キメラL鎖発現ベクター、抗F. X抗体キメラH鎖発現ベクター、そして抗F. X抗体キメラL鎖発現ベクターを、それぞれpcDNA4-g4 XB12H、pcDNA4-g4 XB12L、pIND-g4 SB04HそしてpIND-g4 SB04Lと名付けた。

[0189] [実施例4] キメラ二重特異性抗体の作製

#### 4-1. DNA溶液の調製

抗体右腕HL分子発現用ベクター(pcDNA4-g4 XB12HそしてpcDNA4-g4 XB12L)はテトラサイクリンにより発現誘導がかかる。テトラサイクリンが存在しない状況下で発現を完全に抑制する為にTetリプレッサーをコードするプラスミドpcDNA6/TR(Invitrogen)が要求される。また、抗体左腕HL分子発現用ベクター(pIND-g4 SB04HそしてpIND-g4 SB04L)は昆虫ホルモンであるエクダイソン類似体(ポナステロンA)により発

現誘導がかかる。このとき、ポナステロンAと反応し誘導を行うエクダイソンレセプターとレチノイドXレセプターをコードするプラスミドpVgRXR(Invitrogen)が要求される。従って、動物細胞のトランスフェクションの為に計6種類のプラスミドDNA混液を調製した。細胞培養液10mLの為に、pcDNA4-g4 XB12H, pcDNA4-g4 XB12L, pIND-g4 SB04HそしてpIND-g4 SB04Lを各3  $\mu$  g、pcDNA6/TRそしてpVgRXRを各18  $\mu$  g用いた。

[0190] 4-2. 動物細胞のトランスフェクション

ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株(Invitrogen)を10%FCS (MOREGATE)を含むDMEM培地(Invitrogen)へ懸濁し、 $5 \times 10^5$ 個/mLの細胞密度で接着細胞用ディッシュ(直径10cm, CORNING)の各ディッシュへ10mLずつ蒔きこみCO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5% CO<sub>2</sub>)内で一昼夜培養した。4-1で調製したプラスミドDNA混液をトランスフェクション試薬、Lipofectamine 2000(Invitrogen) 75.8  $\mu$  LとOpti-MEM I培地(Invitrogen) 2708  $\mu$  Lの混液へ加えて室温20分間静置したものを各wellの細胞へ投入し、4~5時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°Cにて5% CO<sub>2</sub>)内でインキュベートした。

[0191] 4-3. 二重特異性IgG抗体の発現誘導

前項のようにトランスフェクションした細胞培養液から培地を吸引除去し、1  $\mu$  g/mLのテトラサイクリン(和光純薬工業)を含む10mL CHO-S-SFM-II(Invitrogen)培地を投入し、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5% CO<sub>2</sub>)内で1日培養して、抗体右腕HL分子の第一次発現誘導を行った。その後、培地を吸引除去し、一旦10 mL CHO-S-SFM-II培地にて洗浄した後、5  $\mu$  MのポナステロンA(Invitrogen)を含む10 mL CHO-S-SFM-II培地を投入し、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5% CO<sub>2</sub>)内で3日間培養して、抗体左腕HL分子の第二次発現誘導を行い培地中へ二重特異性IgG抗体を分泌させた。培養上清を回収した後、遠心分離(約2000g、5分間、室温)して細胞を除去し、さらに0.22  $\mu$  mフィルターMILLEX<sup>(R)</sup>-GV(Millipore)を通して滅菌した。該サンプルは使用するまで4°Cで保存した。

[0192] 4-4. 抗体精製

実施例4-3に記載の方法で得られた10mLの培養上清に100  $\mu$  LのrProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow(Amersham Biosciences)を添加し、4°Cで4時間以上転倒混和し

た。その溶液を $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターカップUltrafree<sup>(R)</sup>-MC(Millipore)に移し、0.01% Tween<sup>(R)</sup> 20を含むTBS 500  $\mu\text{L}$ にて3回洗浄後、rProtein A Sepharose<sup>TM</sup>樹脂を100  $\mu\text{L}$ の 0.01% Tween<sup>(R)</sup> 20を含む10 mM HCl, pH2.0に懸濁して2分間静置したのち、抗体を溶出させた。直ちに、5  $\mu\text{L}$ の1M Tris-HCl, pH8.0を加えて中和した。

[0193] 4-5. ヒトIgG 濃度の定量

Goat anti-human IgG(Biosource International)をcoating bufferにて $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ に調製し、Nunc-Immuno plate(Nunc)に固相化した。Diluent buffer(D. B.)にてブロッキング処理した後、D. B. を用いて適当に希釈した培養上清サンプルを添加した。また、抗体濃度算出のためのスタンダードとして、2000 ng/mLから3倍系列でD. B. にて1段階希釈したヒトIgG4(ヒト型化抗TF抗体、WO 99/51743参照)を同様に添加した。3回洗浄したのち、Goat anti-human IgG, alkaline phosphatase(Biosource International)を反応させた。5回洗浄したのち、Sigma 104<sup>(R)</sup> phosphatase substrate(Sigma-Aldrich)を基質として発色させ、吸光度リーダーModel 3550(Bio-Rad Laboratories)により、参考波長655nmとして405nmの吸光度を測定した。Microplate Manager III(Bio-Rad Laboretories)ソフトウェアを用いて、スタンダードの検量線から培養上清中のヒトIgG濃度を算出した。

[0194] [実施例5] 血漿凝固アッセイ

血友病A血液の凝固能を二重特異性抗体が是正するか明らかにするために、Factor or VIII欠乏血漿を用いた活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)に対する同抗体の影響を検討した。様々な濃度の抗体溶液 50  $\mu\text{L}$ 、Factor VIII欠乏血漿(Biomerieux) 50  $\mu\text{L}$ 及びAPTT試薬(Dade Behring) 50  $\mu\text{L}$ の混合液を37°Cで3分間加温した。凝固反応は20 mMのCaCl<sub>2</sub>(Dade Behring) 50  $\mu\text{L}$ を同混合液に加えることにより開始させた。CR-A(Amelung)が接続されたKC10A(Amelung)により凝固するまでの時間を測定した。

[0195] Factor VIII欠乏血漿の凝固時間を0%、正常血漿の凝固時間を100%としたときに作製される検量線を用いて、二重特異性抗体を添加した際の凝固時間から二重特異性抗体のFactor VIII様活性(%)を算出した。

[0196] [実施例6]二重特異性抗体のヒト化

血液凝固時間の短縮効果が最も高かった抗FactorIXa抗体 XB12および抗FactorX抗体 SB04について、以下のようにヒト化を実施した。

#### 6-1. ヒト抗体の相同性検索

一般公開されているKabat Database (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) およびIMGT Database (<http://imgt.cines.fr/>)よりヒト抗体アミノ酸配列データを入手し、構築したDatabaseを用いてマウスXB12-H鎖可変領域、マウスXB12-L鎖可変領域、マウスSB04-H鎖可変領域、マウスSB04-L鎖可変領域に分けてホモロジー検索を行った。その結果、以下に示すヒト抗体配列と高い相同性を持つことが確認されたことからヒト化抗体のフレームワーク領域(以下、FR)に使用することにした。

(1)XB12-H鎖可変領域:KABATID-020619 (Kabat Database)

(Marietteら、Arthritis Rheum. 1993;36:1315-1324)

(2)XB12-L鎖可変領域:EMBL Accession No. X61642(IMGT Database)

(Markら、J Mol Biol. 1991 ; 222 : 581-597.)

(3)SB04-H鎖可変領域:KABATID-025255 (Kabat Database)

(Demaisonら、Immunogenetics 1995;42:342-352)

(4)SB04-L鎖可変領域:EMBL Accession No. AB064111(IMGT Database)

(Unpublished data)

(1)-(4)のヒト抗体のFRに各マウス抗体の相補性抗原決定領域(以下、CDR)を移植したヒト化抗体を作製した。

[0197] また、NCBIより一般公開されている相同性検索Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を使用して、(1)-(4)のヒト抗体に相同性の高いヒト抗体の分泌シグナル配列を検索した。検索により得られた以下に示す分泌シグナル配列を使用した。

(1)XB12-H鎖可変領域:GenBank Accession No. AF062120

(2)XB12-L鎖可変領域:GenBank Accession No. M74019

(3)SB04-H鎖可変領域:GenBank Accession No. BC019337

(4)SB04-L鎖可変領域:GenBank Accession No. AY204756

[0198] 6-2. ヒト化抗体遺伝子発現ベクターの構築

分泌シグナル配列から抗体可変領域にいたるアミノ酸配列をコードする塩基配列において、50base程度の合成オリゴDNAを3'末端が約20base程度アニールするよう交互に12本作製した。さらに、抗体可変領域遺伝子の5'末端にアニールし、XhoI切断配列を有するプライマーと抗体可変領域遺伝子の3'末端にアニールし、SfiI切断配列を有するプライマーを作製した。

- [0199] 2.5  $\mu$  Mに調製した合成オリゴDNAを各1  $\mu$  Lで混合し、1x TaKaRa Ex Taq Buffer, 0.4mM dNTPs, 0.5units TaKaRa Ex Taq(全て宝酒造)を加え、反応液48  $\mu$  Lになるように調製した。94°C 5分保温した後に、94°C 2分、55°C 2分、72°C 2分からなる反応を2サイクル行い、各合成オリゴDNAのアッセンブルおよび伸長反応を実施した。次に、抗体遺伝子の5'末端および3'末端にアニールするプライマー(各10  $\mu$  M)を1  $\mu$  L添加し、94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 1分からなる反応を35サイクル行い、72°C 5分反応させ、抗体可変領域遺伝子を増幅した。PCR後、反応液全量を1% アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400bp)の増幅断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30  $\mu$  lで溶出した。該断片をpGEM-T Easy Vector Systems (Promega)を用いて、添付説明書記載の方法でクローニングを行った。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、DNAシークエンサーABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems)にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。
- [0200] 正しいヒト化抗体可変領域遺伝子配列であることが確認されたプラスミドをEcoRIおよびSfiIで消化した後に、反応液を1%アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400bp)のDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30  $\mu$  lで溶出した。また、実施例3-3で作製したテトラサイクリン誘導型発現プラスミド(pcDNA4-g4H、pcDNA4-g4L)およびエグダインソ類似体誘導型発現プラスミド(pIND-g4H、pIND-g4L)をEcoRIおよびSfiIで消化した後に、抗体定常領域を含む断片(約5kb)をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30  $\mu$  lで溶出した。EcoRIおよびSfiIで消化したヒト化XB12抗体遺伝子断片(H鎖可変領域またはL鎖可変領域)とEc

EcoRIおよびSfiIで消化したテトラサイクリン誘導型発現プラスミド(pcDNA4-g4H、pcDNA4-g4L)をRapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics)を用いて添付説明書記載の方法で連結反応を行った。また、EcoRIおよびSfiIで消化したヒト化SB04抗体遺伝子断片(H鎖可変領域またはL鎖可変領域)とEcoRIおよびSfiIで消化したエグダイソン類似体誘導型発現プラスミド(pIND-g4H、pIND-g4L)をRapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics)を用いて添付説明書記載の方法で連結反応を行った。各反応液の一部を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株(東洋紡績)を形質転換した。

[0201] また、二重特異性抗体ではない通常のヒト化抗体として発現させるために、以下のようにして発現ベクターを作製した。ニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターを有するpCAGGS (Niwa et al. 1991 Gene, 108: 193-199.)に野生型の抗体定常領域が挿入されたプラスミド(pCAG-g4H、pCAG-g $\kappa$ )をXhoIおよびSfiIで消化し、上記の二重特異性抗体発現ベクターをXhoIおよびSfiIで消化して回収したヒト化XB12抗体遺伝子断片(H鎖可変領域またはL鎖可変領域)またはヒト化SB04抗体遺伝子断片(H鎖可変領域またはL鎖可変領域)を挿入した発現プラスミドを作製した。DNA連結反応はRapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics)を用い、大腸菌DH5 $\alpha$ 株(東洋紡績)を形質転換した。

#### [0202] 6-3. ヒト化二重特異性抗体の調製

4種類のヒト化二重特異性抗体発現ベクターとpcDNA6/TR、pVgRXRを用いて、実施例4-2、4-3に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入および発現誘導を行った。さらに、実施例4-5、4-6に示す方法で抗体精製および抗体濃度の定量を実施した。

#### [0203] 6-4. ヒト化抗体の調製

二重特異性抗体ではない通常のヒト化抗体を発現させるために、実施例6-3で作製したヒト化H鎖抗体発現ベクターおよびヒト化L鎖抗体発現ベクターを用いて実施例4-2に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入を行った。遺伝子導入後に10mLのCHO-S-SFM-II培地(Invitrogen)を添加および除去して洗浄した後に、さらに10mLのCHO-S-SFM-IIを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5% CO<sub>2</sub>)内で3日間培養して、ヒト化抗体を分泌させた。

## [0204] 6-5. ヒト化二重特異性抗体の活性評価および抗体配列の改変

調製したヒト化二重特異性抗体およびキメラ二重特異性抗体(XB12/SB04)の血漿凝固能を評価するために、実施例5の方法に従って、F. VIII欠乏血漿を用いてAPT Tに対する抗体の影響を検討した。血液凝固能が低下したヒト化二重特異性抗体について、活性上昇を目指して、ヒト抗体FRのアミノ酸を改変した。また、熱安定性低下などが危惧されるXB12抗体VHのCDR3のシステイン残基についてもアラニン残基に改変した。具体的には、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、添付説明書記載の方法でヒト化抗体可変領域に変異を導入した。FR配列のアミノ酸改変および血液凝固能の評価を繰り返すことでXB12/SB04と同等の活性を有するヒト化二重特異性抗体(ヒト化XB12抗体(VH:hXB12f-A, VL:hXBVL) / ヒト化SB04抗体(VH:hSB04e, VL:hSBVL-F3f)を取得した。各抗体可変領域配列を以下の配列番号に示した。

- [0205] (1)ヒト化XB12抗体VH (hXB12f-A) 配列番号:1(塩基配列)、配列番号:2(アミノ酸配列)  
(2)ヒト化XB12抗体VL (hXBVL) 配列番号:3(塩基配列)、配列番号:4(アミノ酸配列)  
(3)ヒト化SB04抗体VH (hSB04e) 配列番号:5(塩基配列)、配列番号:6(アミノ酸配列)  
(4)ヒト化SB04抗体VL (hSBVL-F3f) 配列番号:7(塩基配列)、配列番号:8(アミノ酸配列)

## [0206] [実施例7]ヒト化抗体のモデリング

ヒト化SB04抗体のVHとVLの界面のアミノ酸残基を確認するために、MOEソフトウェア(Chemical Computing Group Inc. )を用いて、ホモジーモデリングにより抗体Fv領域モデルを作製した。VHとVLの界面において、H39とL38のアミノ酸はともにグルタミン(Gln)であり、両残基の側鎖により水素結合を形成していることが確認された(図1(A))。また、H45とL44のアミノ酸はそれぞれロイシン(Leu)とプロリン(Pro)であり、両残基の側鎖は非常に近接し、かつ疎水性コアを形成していることが確認された(図1(B))。これらの2箇所のアミノ酸残基は、ヒト抗体において高く保存されていることが報

告されている(Vargas-Madrazo E et al. J. Mol. Recognit. 2003, 16: 113–120)。H3 9, L38, H45, L44などの抗体のナンバーリングについては、Kabatらの文献(Kabat E A et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)を参考にしている。

[0207] [実施例8]H39, L38のアミノ酸を改変したヒト化抗体の作製と評価

8－1. H39およびL38を改変した抗体発現ベクターの構築

ヒト化XB12のH鎖とヒト化SB04のL鎖の会合を阻害するように、実施例7の知見に基づいてヒト化XB12 H鎖のH39のグルタミンとヒト化SB04 L鎖のL38のグルタミンを置換した。具体的には、グルタミンの側鎖の水素結合を阻害して電荷的に反発するように、両アミノ酸(H39, L38)を側鎖に正の電荷を持つリジン(Lys)またはアルギニン(Arg)、側鎖に負の電荷を持つグルタミン酸(Glu)またはアスパラギン酸(Asp)に置換した。ヒト化抗体遺伝子の置換は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、添付説明書記載の方法で変異を導入した。アミノ酸が置換された各ヒト化抗体遺伝子断片は、実施例6－2で使用した二重特異性抗体発現ベクターまたは通常の抗体発現ベクターに挿入した。

[0208] 8－2. 会合制御評価用抗体の調製と会合制御評価

H鎖とL鎖の会合制御について評価するために、作製したヒト化XB12 H鎖(H39改変)、ヒト化SB04 L鎖(L38改変)、野生型ヒト化XB12 L鎖の3種類の抗体発現ベクターを用いて、実施例4－2に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入し、培養上清中に抗体を分泌させた。さらに、実施例4－5、4－6に示す方法で抗体精製および抗体濃度の定量を実施した。

[0209] 精製抗体200ngをサンプルバッファー(TEFCO)中で還元処理し、14% SDS-PAGE miniゲル(TEFCO)に注入して、電気泳動を行った。電気泳動後、10%メタノールを含む7%酢酸溶液に30分間浸して固定処理を行い、SYPRO<sup>(R)</sup>Ruby protein gel stain液(BIO-RAD)に一昼夜浸して染色を行った。次に、10%メタノールを含む7%酢酸溶液に1時間浸して脱色処理を行い、蛍光検出装置FluorImagerSI(Amersham Biosciences)を用いて、画像解析し、イメージング画像を取得した。得られた画像を用いて、Image Quant ver4. 2 (Amersham Biosciences)によりH鎖およびL鎖のバンドの蛍光強度を算

出した。

[0210] 結果を図2に示した。算出した蛍光強度強度値を用いて、目的となるXB12-L鎖の比率(%)を「XB12-L鎖／L鎖総量(XB12-L鎖 + SB04-L鎖)×100」で算出した。ヒト化XB12 H鎖(H39)およびヒト化SB04 L鎖(L38)のアミノ酸が野生型のグルタミン(Gln)である場合には50%であるのに対して、H39およびL38を置換した場合にはヒト化XB12 L鎖の比率が上昇し、グルタミン酸(Glu)に置換した場合には82%と1.6倍上昇することが確認された。

[0211] 8-3. 凝固活性評価用の二重特異性抗体の調製と凝固活性評価

凝固活性について評価するために、作製したヒト化XB12 H鎖(H39改変)およびヒト化SB04 L鎖(L38改変)二重特異性抗体発現ベクターと野生型のヒト化XB12 L鎖およびヒト化SB04 H鎖二重特異性抗体発現ベクター、pcDNA6/TR、pVgRXRを用いて、実施例4-2、4-3に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入および発現誘導を行った。さらに、実施例4-5、4-6に示す方法で抗体精製および抗体濃度の定量を実施した。

凝固活性の評価は実施例5に示す方法で実施した。結果を図3に示した。会合制御評価で82%まで比率が上昇したグルタミン酸(Glu:E)改変抗体において、野生型と比較して同等以上の凝固活性を示すことが確認された。

[0212] 8-4. 結合活性評価用抗体の調製

FactorIXaおよびFactorXへの結合活性について評価するために、ヒト化XB12 H鎖(H39改変)および野生型ヒト化XB12 L鎖抗体発現ベクター、または野生型ヒト化SB04 H鎖およびヒト化SB04 L鎖(L38改変)抗体発現ベクターを用いて、実施例4-2に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入し、培養上清中に抗体を分泌させた。さらに、実施例4-5、4-6に示す方法で抗体精製および抗体濃度の定量を実施した。

[0213] FactorIXaおよびFactorXに対する結合活性の評価は、実施例1-2、2-2に示す方法で実施した。結果を図4、図5に示した。H39およびL38のアミノ酸を置換しても結合活性に変化はないことが確認された。

[0214] 以上の結果から、XB12 H鎖のH39およびSB04 L鎖のL38を改変することにより抗原への結合活性、FactoVIIIを代替する凝固活性という生物活性を低下させることなく、

目的とする二重特異性抗体の比率を上昇させることが可能であることが示唆された。ポリペプチド中の一箇所のアミノ酸に変異を導入するだけで、機能を低下させずに会合を制御した例は、knobとholeを用いた方法を含めてこれまでに報告がなく、はじめての知見であるといえる。

[0215] [実施例9]L44のアミノ酸を改変したヒト化抗体の作製と評価

9－1. L44を改変した抗体発現ベクターの構築

ヒト化XB12のH鎖とヒト化SB04のL鎖の会合を阻害するように、実施例7の知見に基づいてヒト化SB04 L鎖のL44のプロリンを側鎖に電荷を有するアミノ酸に置換した。具体的には、VHとVLの界面の疎水性コアに存在するプロリンを側鎖に正の電荷を持つリジン(Lys)またはアルギニン(Arg)、側鎖に負の電荷を持つグルタミン酸(Glu)またはアスパラギン酸(Asp)に置換した。ヒト化抗体遺伝子の置換は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、添付説明書記載の方法で変異を導入した。アミノ酸が置換された各ヒト化抗体遺伝子断片は、実施例6－2で使用した二重特異性抗体発現ベクターまたは通常の抗体発現ベクターに挿入した。

[0216] 9－2. 会合制御評価用抗体の調製と会合制御評価

H鎖とL鎖の会合制御について評価するために、作製したヒト化SB04 L鎖(L44改変)、野生型ヒト化XB12 H鎖、野生型ヒト化XB12 L鎖の3種類の抗体発現ベクターを用いて、実施例4－2に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入し、培養上清中に抗体を分泌させた。さらに、実施例4－5、4－6に示す方法で抗体精製および抗体濃度の定量を実施した。

[0217] 精製抗体200ngをサンプルバッファー(TEFCO)中で還元処理し、14% SDS-PAGE miniゲル(TEFCO)に注入して、電気泳動を行った。電気泳動後、10%メタノールを含む7%酢酸溶液に30分間浸して固定処理を行い、SYPRO<sup>(R)</sup>Ruby protein gel stain液(BIO-RAD)に一昼夜浸して染色を行った。次に、10%メタノールを含む7%酢酸溶液に1時間浸して脱色処理を行い、蛍光検出装置FluorImagerSI(Amersham Biosciences)を用いて、画像解析し、イメージング画像を取得した。得られた画像を用いて、Image Quant ver4. 2 (Amersham Biosciences)によりH鎖およびL鎖のバンドの蛍光強度を算出した。

- [0218] 結果を図6に示した。算出した蛍光強度強度値を用いて、目的となるXB12-L鎖の比率(%)を「XB12-L鎖／L鎖総量(XB12-L鎖 + SB04-L鎖) × 100」で算出した。ヒト化SB04 L鎖(L44)のアミノ酸が野生型のプロリン(Pro)である場合には47%であるのにに対して、L44を置換した場合にはヒト化XB12 L鎖の比率が上昇し、86–90%と1.8–1.9倍上昇することが確認された。
- [0219] 9–3. 凝固活性評価用の二重特異性抗体の調製と凝固活性評価  
凝固活性について評価するために、作製したヒト化SB04 L鎖(L44改変)二重特異性抗体発現ベクターと野生型のヒト化XB12 H鎖、ヒト化XB12 L鎖およびヒト化SB04 H鎖二重特異性抗体発現ベクター、pcDNA6/TR、pVgRXRを用いて、実施例4–2、4–3に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入および発現誘導を行った。さらに、実施例4–5、4–6に示す方法で抗体精製および抗体濃度の定量を実施した。
- [0220] 凝固活性の評価は実施例5に示す方法で実施した。結果を図7に示した。会合制御評価で比率が上昇した全ての改変抗体において、野生型の凝固活性を上回る凝固活性を示すことが確認された。
- [0221] 9–4. 結合活性評価用抗体の調製  
FactorXへの結合活性について評価するために、野生型ヒト化SB04 H鎖およびヒト化SB04 L鎖(L44改変)抗体発現ベクターを用いて、実施例4–2に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入し、培養上清中に抗体を分泌させた。さらに、実施例4–6に示す方法で培養上清中の抗体濃度の定量を実施した。
- [0222] FactorXに対する結合活性の評価は、培養上清を用いて実施例2–2に示す方法で実施した。結果を図8に示した。L44のアミノ酸を置換しても結合活性に変化はないことが確認された。
- [0223] 以上の結果から、SB04 L鎖のL44という一箇所のアミノ酸を改変することにより抗原への結合活性、FactoVIIIを代替する凝固活性という生物活性を低下させることなく、目的とする二重特異性抗体の比率を上昇させることが可能であることが示唆された。ポリペプチド中の一箇所のアミノ酸に変異を導入するだけで、機能を低下させずに会合を制御した例は、knobとholeを用いた方法を含めてこれまでに報告がなく、はじめての知見であるといえる。

[0224] [実施例10] H39, L38のアミノ酸およびL44のアミノ酸を改変したヒト化抗体の作製と評価

#### 10-1. H39, L38のアミノ酸L44を改変した抗体発現ベクターの構築

ヒト化XB12のH鎖とヒト化SB04のL鎖の会合を阻害するように、実施例8および9の知見に基づいてヒト化XB12 H鎖のH39とヒト化SB04 L鎖のL38およびL44を側鎖に電荷を有するアミノ酸に置換した。具体的には、ヒト化XB12 H鎖のH39とヒト化SB04 L鎖のL38の両アミノ酸を実施例8において最も効果が見られたグルタミン酸(Glu)に置換し、且つヒト化SB04 L鎖のL44に存在するプロリンを側鎖に正の電荷を持つリジン(Lys)またはアルギニン(Arg)、側鎖に負の電荷を持つグルタミン酸(Glu)またはアスパラギン酸(Asp)に置換した。ヒト化抗体遺伝子の置換は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、添付説明書記載の方法で変異を導入した。アミノ酸が置換された各ヒト化抗体遺伝子断片は、実施例6-2で使用した二重特異性抗体発現ベクターまたは通常の抗体発現ベクターに挿入した。

[0225] 10-2. 会合制御評価用抗体の調製と会合制御評価

H鎖とL鎖の会合制御について評価するために、改変型ヒト化SB04 L鎖、改変型ヒト化XB12 H鎖、野生型ヒト化XB12 L鎖の3種類の抗体発現ベクターを用いて、実施例4-2に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入し、培養上清中に抗体を分泌させた。さらに、実施例4-5、4-6に示す方法で抗体精製および抗体濃度の定量を実施した。

[0226] 精製抗体200ngをサンプルバッファー(TEFCO)中で還元処理し、14% SDS-PAGE miniゲル(TEFCO)に注入して、電気泳動を行った。電気泳動後、10%メタノールを含む7%酢酸溶液に30分間浸して固定処理を行い、SYPRO<sup>(R)</sup>Ruby protein gel stain液(BIO-RAD)に一昼夜浸して染色を行った。次に、10%メタノールを含む7%酢酸溶液に1時間浸して脱色処理を行い、蛍光検出装置FluorImagerSI(Amersham Biosciences)を用いて、画像解析し、イメージング画像を取得した。得られた画像を用いて、Image Quant ver4.2 (Amersham Biosciences)によりH鎖およびL鎖のバンドの蛍光強度を算出した。

[0227] 結果を図9に示した。算出した蛍光強度強度値を用いて、目的となるXB12-L鎖の

比率(%)を「XB12-L鎖／L鎖総量(XB12-L鎖 + SB04-L鎖) x 100」で算出した。ヒト化XB12 H鎖(H39)およびヒト化SB04 L鎖(L38)の両アミノ酸がグルタミン酸(Glu)に改変され、ヒト化SB04 L鎖(L44)は野生型のプロリン(Pro)であるた場合は82%であるのにに対して、ヒト化XB12 H鎖(H39)およびヒト化SB04 L鎖(L38)の両アミノ酸のグルタミン酸(Glu)への改変に加えて、L44を置換した場合にはヒト化XB12 L鎖の比率が94–96%まで上昇した。この比率の向上は、実施例9においてL44を単独で置換した86–90%よりも高かった。

[0228] 10–3. 凝固活性評価用の二重特異性抗体の調製と凝固活性評価

凝固活性について評価するために、作製した改変型のヒト化XB12 H鎖、ヒト化XB12 L鎖およびヒト化SB04 H鎖二重特異性抗体発現ベクターと野生型のヒト化XB12 H鎖、ヒト化XB12 L鎖およびヒト化SB04 H鎖二重特異性抗体発現ベクター、pcDNA6/TR、pVgRXRを用いて、実施例4–2、4–3に示す方法でHEK293Hへ遺伝子導入および発現誘導を行った。さらに、実施例4–5、4–6に示す方法で抗体精製および抗体濃度の定量を実施した。

[0229] 凝固活性の評価は実施例5に示す方法で実施した。結果を図10に示した。会合制御評価で比率が上昇した全ての改変抗体において、野生型の凝固活性と同等の凝固活性を示すことが確認された。

[0230] 10–4. 結合活性評価用抗体の調製

FactorXへの結合活性について評価するために、野生型ヒト化SB04 H鎖および改変型ヒト化SB04 L鎖抗体発現ベクターを用いて、実施例4–2に示す方法でHEK293 Hへ遺伝子導入し、培養上清中に抗体を分泌させた。さらに、実施例4–6に示す方法で培養上清中の抗体濃度の定量を実施した。

[0231] FactorXに対する結合活性の評価は、培養上清を用いて実施例2–2に示す方法で実施した。結果を図11に示した。L38とL44の両アミノ酸を置換しても結合活性に変化はないことが確認された。

[0232] 以上の結果から、XB12 H鎖のH39およびSB04 L鎖のL38、L44のアミノ酸を改変することにより抗原への結合活性、FactoVIIIを代替する凝固活性という生物活性を低下させることなく、目的とする二重特異性抗体の比率を上昇させることが可能であること

が示唆された。二重特異性抗体の比率については、界面のアミノ酸改変の数を増すことにより上昇することが確認された。

[0233] [実施例11] hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の構造異性体の分離、構造決定

11-1. ヒト化抗ヒトMpl抗体hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の作製

ヒト化抗Mpl抗体であるhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2(以下u2-wz4)の作製方法はWO2005/56604に示されている。該遺伝子は、リンカー配列(GlyGlyGlyGlySer)x3をコードする塩基配列を用いて、VH—リンカー配列—VL—リンカー配列—VH—リンカー配列—VLで構成される塩基配列(配列番号:12; WO2005/56604の配列番号:286参照)を持つようにPCR法により作製した。遺伝子の塩基配列を確認した後、DNA断片を発現ベクターpCXND3にクローニングして発現ベクターを構築し、CHO-DG44細胞に遺伝子導入することで、安定発現細胞株を作製した。具体的には、発現ベクター(20 μg)とPBSに懸濁したCHO-DG44細胞(1×10<sup>7</sup>細胞/mL)の0.75 mLを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後にGene Pulser Xcell(BioRad)を用いて1.5 kV、25 μFDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、500 μg/mL Geneticin(Invitrogen)を含むCHO-S-SFMII培地(Invitrogen)に加えて選抜し、u2-wz4産生CHO細胞株を樹立した。

[0234] ヒト化抗体 hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2はFlagタグを付加していないことから、培養上清からの精製は、認識するエピトープであるMG10(ヒトMplアミノ酸配列のGln213からAla231)とGST融合蛋白質を利用して行った。MG10とGST融合蛋白質の精製は、Glutathione Sepharose 4B(Amersham Biosciences社製)を用いて、メーカーのプロトコールに従って精製した。さらに、精製したMG10とGST融合蛋白質をメーカーのプロトコールに従って、HiTrap NHS-activated HP(Amersham Biosciences社製)に固定化し、アフィニティカラムを作製した。ヒト化抗体hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2発現CHO細胞の培養上清をMG10-GST融合蛋白質固定化カラムに流し、ヒト化抗体hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2を吸着させ、100 mM Glycine-HCl(pH 3.5), 0.01 % Tween80で溶出させた。溶出画分は直ちに1 M Tris-HCl(pH 7.4)で中和を行い、HiLoad 16/60 Superdex200pg(Amersham Biosciences社製)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、モノマーを精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーの緩衝液は、20 mMクエン酸緩衝液(pH 7.5)

, 300 mM NaCl, 0.01 % Tween 80を使用した。

[0235] 11-2. hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の構造異性体の分離、精製

hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2はVH<sub>1</sub>-linker-VL<sub>2</sub>-linker-VH<sub>3</sub>-linker-VL<sub>4</sub>の配列を有するsc(Fv)2であることから、VB22B sc(Fv)2と同様に構造はFv(VH, VL間で非共有結合した分子)の組み合わせにより、VH<sub>1</sub>とVL<sub>2</sub>、VH<sub>3</sub>とVL<sub>4</sub>がそれぞれFvを形成するbivalent scFv型と、VH<sub>1</sub>とVL<sub>4</sub>、VH<sub>2</sub>とVL<sub>3</sub>がそれぞれFvを形成するsingle chain diabody型の2種類の構造異性体が存在すると考えられる(図12)。

[0236] hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の構造異性体の分離を検討した結果、陽イオン交換クロマトグラフィーBioAssist S(TOSOH)を用いて、下記の溶離条件によりhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の各種成分の分離できることが示唆された。

[0237] 移動相A : 20 mM sodium phosphate, pH 7.5

移動相B : 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.5

流速 : 0.8 ml/min

グラジエント : B 0% → B 35%(30 min)

[0238] 上記条件により、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2は2つのピークに分離した。図13に示すようなクロマトグラムが得られ、保持時間の短いピークからそれぞれ、peak1、peak2と命名した。

peak1及びpeak2に関して、Q-TOF型質量分析計(Q Tof Ultima, Micro Mass)を用いて分子量の測定を行った。Q-TOFにinfusionにて試料溶液を導入し、得られた多価イオンスペクトル(+)を、付属ソフト(MassLynx)を用いたデコンボリューションを行った結果、peak1の分子量として53768 Da、peak2の分子量とし53769 Daを得た。このことから、peak1とpeak2は同一の分子量を有することが分かった。

[0239] peak1及びpeak2に関して、ペプチドマッピングを行った。還元変性、carboxymethyl化後、トリプシンを用いてペプチド断片に分解し、逆相クロマトグラフィー(YMC-Pack-ODS)によりペプチドマップを得た。peak1とpeak2のペプチドマップを比較したところ、図14に示すようにpeak1とpeak2のマッピングのパターンは同一であったことから、アミノ酸一次構造は同一であることが分かった。

[0240] hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2は糖鎖付加がなく、peak1とpeak2はTOF-MASS測定による

分子量が同一であること、peak1とpeak2はマッピングのパターンが同一であることから、peak1とpeak2は互いに異なる立体構造を有する構造異性体(conformational isomer)であることが分かった。

- [0241] hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2はVH<sub>1</sub>-linker-VL<sub>2</sub>-linker-VH<sub>3</sub>-linker-VL<sub>4</sub>の配列を有するsc(Fv)2であることから、図12に示すとおり、構造はFv(VH, VL間で非共有結合した分子)の組み合わせにより、VH<sub>1</sub>とVL<sub>2</sub>、VH<sub>3</sub>とVL<sub>4</sub>がそれぞれFvを形成するbivalent sc Fv型と、VH<sub>1</sub>とVL<sub>4</sub>、VH<sub>2</sub>とVL<sub>3</sub>がそれぞれFvを形成するsingle chain diabody型の2種類の構造異性体が存在し、peak1とpeak2はそれぞれbivalent scFv型とsingle chain diabody型のどちらかの構造であると考えられた。
- [0242] 2種類の構造異性体を同定する分析法として、プロテアーゼ限定分解法を見出した。sc(Fv)2のリンカー部分は、比較的自由な構造を取っているためプロテアーゼに対する耐性が低いと考えられ、プロテアーゼの一種であるsubtilisin Aを用いて、以下の条件でpeak1及びpeak2及びhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 (peak1 : peak2 ~ 1 : 4)と反応させた。
- [0243] 20 mM sodium citrate, 150 mM NaCl, pH 7.5  
hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak1 or peak2 : 0.15 mg/mL  
Subtilisin A : 10 μg/mL  
37°C, 30 min
- [0244] 反応後、Phastgel Homogeneous 12.5 %を用いて、還元SDS-PAGEを行った。その結果、図15に示すとおり、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk、peak1、peak2いずれも同様のバンドパターンを示した。hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の3箇所のリンカー部分の切断によると思われる各断片の特異的なバンドが得られたことから、上記反応条件を用いることで、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2のリンカー部分を部分的且つ限定期に分解できることが分かった。
- [0245] bivalent scFv型とsingle chain diabody型の構造において、3つのうちのリンカーの一箇所の切断が起こった場合、図16に示すように、未変性状態では、VHとVLの間の非共有的な結合によりsingle chain diabody型の構造においては、3つのうちのどのリンカーに切断が起こっても見かけの分子量には変化が見られないが、bivalent scFv

型においては、中央のリンカーに切断が起こった場合、半分の分子量の分子種が生成する。そこで、上記反応条件により部分的にリンカーを切断した、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulk、peak1、peak2をTSK SuperSW2000(TOSOH)を用いてゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーは以下の条件で行った。

- [0246] 移動相：DPBS(−) pH7.4  
流速：0.2ml/min
- [0247] その結果、図17に示すように、peak2においては低分子量のピークが全く確認されなかったのに対して、peak1においては低分子量(約半分の分子量)のピークが確認された。peak1とpeak2の混合物であるhVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 bulkは、peak1の存在比に相当する量の低分子量のピークが確認された。よって、本結果より、peak1がbivalent scFv型であり、peak2がsingle chain diabody型であると同定された。
- [0248] [実施例12] VH/VL界面改変型sc(Fv)2の作製、構造異性体分析および同定  
12-1. VH/VL界面改変型sc(Fv)2の作製  
VH/VL界面改変による会合制御を低分子化抗体であるsc(Fv)2に応用し、sc(Fv)2の構造異性体形成を制御できるかどうかを確認するために以下の方法でVH/VL界面改変型sc(Fv)2を作製した。
- [0249] u2-wz4のVH/VL界面を形成するアミノ酸であるVHの39位(配列番号：13に記載のアミノ酸配列における39位； WO2005/56604の配列番号：289参照)のGlnとVLの38位(配列番号：14に記載のアミノ酸配列における43位； WO2005/56604の配列番号：289参照)のGlnを以下のようにして改変した。はじめに、VH1の39位のGln(遺伝子コードンCAG)をGlu(遺伝子コードンGAG)に、VL2の38位のGln(遺伝子コードンCAG)をGlu(遺伝子コードンGAG)に、VH3の39位のGln(遺伝子コードンCAG)をLys(遺伝子コードンAA G)に、VL4の38位のGln(遺伝子コードンCAG)をLys(遺伝子コードンAAG)に改変した遺伝子hVB22B u2-wz4(v1) sc(Fv)2(以下v1、塩基配列を配列番号：15に、該塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：16に示す)を作製した。さらに、VH1の39位のGln(遺伝子コードンCAG)をGlu(遺伝子コードンGAG)に、VL2の38位のGln(遺伝子コードンCAG)をLys(遺伝子コードンAAG)に、VH3の39位のGln(遺伝子コードンCA G)をLys(遺伝子コードンAAG)に、VL4の38位のGln(遺伝子コードンCAG)をGlu(遺伝子

コドンGAG)に改変した遺伝子hVB22B u2-wz4(v3) sc(Fv)2(以下v3、塩基配列を配列番号:17に、該塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号:18に示す)を作製した。遺伝子の改変はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATA GENE社製)を用いてメーカーのプロトコールに従い、点突然変異を導入した。各遺伝子の塩基配列を確認した後、DNA断片を発現ベクターpCXND3にクローニングして発現ベクターを構築し、CHO-DG44細胞に遺伝子導入することで、安定発現細胞株を作製した。実施例11に示す方法でv1産生CHO細胞株およびv3産生CHO細胞株を樹立した。

[0250] 改変体v1, v3は実施例11に示す方法で、MG10-GST融合蛋白質固定化カラムを用いてモノマー分子を精製した。図18に示したゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、改変体v1, v3は培養上清中でダイマー以上の凝集体が低下し、モノマー比率は改変前のu2-wz4の59 %と比較して、v1が89 %、v3が77 %と上昇していることが明らかになった。改変体v1, v3はVH/VL界面のアミノ酸を改変することにより、電荷的な反発により好ましくない会合を阻害し、好ましい会合を促進したことが推測される。以上のことからこの会合制御により、効率的なモノマー分子の発現に成功した。

[0251] 12-2. VH/VL界面改変型sc(Fv)2の構造異性体分析および同定

得られたVH/VL界面改変体であるv1、v3および未改変体であるu2-wz4の構造異性体存在比を陽イオン交換クロマトグラフィーおよび等電点電気泳動により分析した。また、プロテアーゼ限定分解法による構造同定を実施した。

[0252] 陽イオン交換クロマトグラフィーは以下のとおり実施した。

カラム: TSK-gel Bioassist S, 4.6 mm φ × 50 mm (TOSOH社製)

流速: 0.8 mL/min

検出波長: 220 nm

溶出条件:

Eluent A: 20 mmol/L Phosphate buffer (pH 7.0)

Eluent B: 20 mmol/L Phosphate buffer / 500 mmol/L NaCl (pH 7.0)

グラジェント:

Time (min)      B%

0	0
5	0
25	30
25.1	100
35	100
35.1	0

[0253] 等電点電気泳動は以下のとおり実施した。PhastGel Dry IEFゲル(Amersham Biosciences社製)を以下のゲル膨潤液にて30分以上膨潤した。試料を先に膨潤させたゲルに添加し、PhastSystemにより以下の泳動条件で電気泳動した。泳動後、20 % TCA溶液に30分間浸した後、ミリQ水で5分間 × 3回以上洗浄し、試料のたんぱく質濃度に応じてクマシー染色、または銀染色した。クマシー染色では、染色液として0.1 % CuSO<sub>4</sub>(w/v)を含む0.02 % CBBを用い、染色を行い、10 % 酢酸を含む30 % メタノールで脱色した。銀染色では、Silver stain kit, Protein (Amersham Biosciences社製)を用い、キットに添付された標準プロトコールにより染色を行った。

[0254] <ゲル膨潤液>

Pharmalyte 8.5-10	80 μL
Biolyte 7-9	10 μL
Biolyte 3-9	10 μL
20 % Glycerol	2.0 mL

[0255] <電気泳動プログラム>

SAMPLE APPLICATION DOWN AT step2	0 Vh
SAMPLE APPLICATION UP AT step3	0 Vh
Step 1	2000 V    2.5 mA    3.5 W    15°C    75 Vh
Step 2	200 V    2.5 mA    3.5 W    15°C    15 Vh
Step 3	2000 V    2.5 mA    3.5 W    15°C    410 Vh

[0256] プロテアーゼ限定分解法による構造同定は以下の条件で実施した。subtilisin Aを用いて、以下の条件でu2-wz4精製peak1とu2-wz4精製peak2、及び、改変体v1と改変体v3を反応させた。

20mM sodium citrate, 150 mM NaCl, pH 7.5  
hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2 peak1 or peak2 : 0.15 mg/mL  
Subtilisin A : 10  $\mu$  g/mL  
37°C, 30 min

[0257] 得られた反応液をゲルろ過クロマトグラフィーにより以下の条件で分析した。

Column : TSKgel Super2000sw (TOSOH)  
Eluent : 50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH 7.0  
Flow rate : 0.2 ml/min  
Detection : 220 nm

[0258] 図19および図20に示した陽イオン交換クロマトグラフィーと等電点電気泳動による構造異性体の分析結果から、u2-wz4は24 %がbivalent scFv型、76 %がsingle chain diabody型として両構造異性体の混合物として発現しているのに対して、改変体v1は100 %がsingle chain diabody型の構造異性体として発現しており、改変体v3は100 %がbivalent scFv型の構造異性体として発現していることが分かった。また図21に示すとおり、プロテアーゼ限定分解の結果からも、改変体v3はu2-wz4精製peak1と同様に低分子のピークが見られ、改変体v1はu2-wz4精製peak2と同様に低分子のピークが見られなかつたことから、改変体v1はsingle chain diabody型の構造異性体として発現しており、改変体v3はbivalent scFv型の構造異性体として発現していることが示された。

[0259] [実施例13] VH/VL界面改変型sc(Fv)2の活性評価および安定性評価

### 13-1. VH/VL界面改変型sc(Fv)2の生物活性評価

抗ヒトMpl抗体VB22B sc(Fv)2は、文献(Blood 2005;105:562-566)においてTPO様アゴニスト活性を示すことが報告されている。そこで、TPO依存性増殖を示すBaF3-human MplまたはBaF3-monkey Mplを用いて分離した構造異性体のTPO様アゴニスト活性を評価した。

[0260] 各細胞を1 % Fetal Bovine Serum(Invitrogen)を含むRPMI1640 (Invitrogen)で2回洗浄した後、 $4 \times 10^5$  cells/mLとなるように10 % Fetal Bovine Serumを含むRPMI1640に懸濁し、60  $\mu$  L/wellで96 well plateに分注した。rhTPO (R&D)または構造異性体サンプルの濃度を振り、各wellに40  $\mu$  L加え、37°C、5 % CO<sub>2</sub>条件下で、24時間培養した。

10 μL/wellでWST-8試薬(Cell Count Reagent SF、ナカライトスク)を加え、直後にBenchmark Plusを用いて450 nmの吸光度(対照655 nm)を測定し、2時間培養後に、再度450 nmの吸光度(対照655 nm)を測定した。WST-8試薬は生細胞数に応じて450 nmの発色反応を呈することから、2時間の吸光度変化を指標にTPO様アゴニスト活性を評価した。

- [0261] 精製したVB22B sc(Fv)2の構造異性体を用いて、BaF3-human Mpl、BaF3-monkey MplにおけるTPO様アゴニスト活性を評価した結果をそれぞれ図17に示す。peak1とpeak2の構造異性体のアゴニスト活性を比較すると、peak2の方が著しく高い活性を示すことが明らかになった。このことから、抗Mpl抗体sc(Fv)2がTPO様アゴニスト活性を発揮するためには、single chain diabodyの構造を取る必要があることが示唆された。
- [0262] 実施例1に示す方法に従って、VH/VL界面改変体v1およびv3のアゴニスト活性の評価を行った。アゴニスト活性は構造異性体間で大きく異なり図12に示すように、single chain diabody構造のpeak2が非常に高いアゴニスト活性を示すのに対して、bivalent scFv構造のpeak1の活性は極めて低下する。図22に示すとおり、改変体v1はpeak2と同等の活性を示し、改変体v3はpeak1とほぼ同等の活性を示した。以上のことから生物活性においても、改変体v1がsingle chain diabody構造を、改変体v3がbivalent scFv構造を形成していることが確認された。
- [0263] 13-2. VH/VL界面改変型sc(Fv)2の安定性評価  
u2-wz4精製peak1とu2-wz4精製peak2、および、改変体v1と改変体v3の安定性評価として、示走査型熱量測定(Differential Scanning Calorimetry)を用いて変性中間温度(Tm値)の測定を以下の条件下で行った。

DSC : N-DSCII (Applied Thermodynamics社製)

溶液条件: 20 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, pH 7.0

タンパク質濃度: 0.1 mg/mL

スキャニング速度: 1°C/分

- [0264] 各DSC測定の結果を図23に示した。u2-wz4精製peak2と改変体v1のTm値は未改変体とほぼ同等であり、安定性は同等であることが分かった。u2-wz4精製peak1と改変体v3とでは、若干改変体v3のほうが低い安定性を示した。knobs-into-hole 技術を

用いた方法による界面制御においては、例えばIgGのCH3ドメインのヘテロ会合において、未改変CH3ドメインのT<sub>m</sub>値が80.4°Cであったのに対して、改変CH3ドメインのT<sub>m</sub>値は69.4°Cであり、大幅にT<sub>m</sub>値が低下し安定性が低下してしまうことが報告されている(Acta Pharmacol Sin. 2005 26(6):649–58)。それに対して、本発明においては安定性を低下させること無く会合を制御できることが確認された。

[0265] 続いて、u2-wz4精製peak1とu2-wz4精製peak2およびVH/VL界面改変体である改変体v1と改変体v3の安定性評価として、以下の条件における熱加速試験による安定性評価を実施した。

[0266] <熱加速条件>

溶液条件:20 mM sodium citrate, pH 6.0

タンパク質濃度:0.25 mg/mL

加速条件:40°C – 6 day, 12 day

[0267] 热加速サンプルは、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーにより以下の条件で分析した。

[0268] 図24に示すとおり、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析の結果、u2-wz4精製peak2と改変体v1のモノマー残存率はほぼ同等であり、会合化に対する安定性はほぼ同等であることが確認された。また、u2-wz4精製peak1と改変体v3のモノマー残存率もモノマー残存率はほぼ同等であり、両構造異性体において会合化に対する安定性はほぼ同等であることが分かった。

[0269] 図25に示すとおり、陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析の結果、未改変体の精製peak1は異性化反応によりpeak2に異性化し、未改変体精製peak2は異性化反応によりpeak1に異性化したのに対して、VH/VL界面改変体v1とv3は熱加速後も異性化反応は起こさなかった。VH/VL界面の改変を適用することによって、2種類の構造異性体のうち一方のみの構造異性体が100%の状態で発現できることに加えて、得られた各構造異性体は異性化反応を起こさず安定に保存可能であることが分かった。

[0270] 本実施例において、v1およびv3に適用したVH/VL界面改変を用いることによって、2種類の構造異性体のうち一方のみの構造異性体が100 %存在する状態で発現できることを見出した。目的の構造の一本鎖抗体を得るためのVH/VL界面制御としては、

knobs-into-hole 技術を用いてBispecific diabodyの構造を制御する方法(Protein Sci . 1997 Apr;6(4):781–8, Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation., Zhu Z, Presta LG, Zapata G, Carter P.)が知られている。この方法では、VH/VL界面あたり合計4箇所のアミノ酸を改変することにより目的のヘテロダイマー構造の形成率が72 %から92 %まで上昇したことを報告している。それに対して、本発明は4箇所のアミノ酸を改変することにより、熱安定性および構造異性体の安定性を低下させることなく、目的の構造を100 %の比率で取得することに成功した。

[0271] [実施例14]ハイブリッドL鎖を持つ二重特異性抗体のヒト化

血液凝固時間の短縮効果が最も高かった抗FactorIXa抗体 A69–VH、抗FactorX抗体 B26–VH、ハイブリッドL鎖(BBA)の組み合わせから成る二重特異性抗体(特願2005-112514)について、以下のようにヒト化を実施した。

[0272] 14-1. ヒト抗体の相同性検索

一般公開されているKabat Database (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) およびIMGT Database (<http://imgt.cines.fr/>)よりヒト抗体アミノ酸配列データ入手し、構築したDatabaseを用いてマウスA69–H鎖可変領域(アミノ酸配列: 配列番号: 57)、マウスB26–H鎖可変領域(アミノ酸配列:配列番号:58)、マウスBBA–L鎖可変領域(アミノ酸配列:配列番号:59)に分けてホモジジー検索を行った。その結果、以下に示すヒト抗体配列と高い相同性を持つことが確認されたことからヒト化抗体のフレームワーク領域(以下、FR)に使用することにした。

(1)A69–H鎖可変領域:KABATID-000064 (Kabat Database)

(Kippsら、J Clin Invest. 1991;87:2087–2096)

(2)B26–H鎖可変領域:EMBL Accession No. AB063872(IMGT Database)

(Unpublished data)

(3) BBA–L鎖可変領域:KABATID-024300 (Kabat Database)

(Welschofら、J Immunol Method. 1995;179:203–214)

(1)–(3)のヒト抗体のFRに各マウス抗体の相補性抗原決定領域(以下、CDR)を移植したヒト化抗体を作製した。

[0273] また、NCBIより一般公開されている相同性検索Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

nih.gov/BLAST/)を使用して、(1)–(3)のヒト抗体に相同性の高いヒト抗体の分泌シグナル配列を検索した。検索により得られた以下に示す分泌シグナル配列を使用した。

(1) A69-H鎖可変領域: GenBank Accession No. AF062257

(2) B26-H鎖可変領域: GenBank Accession No. AAC18248

(3) BBA-L鎖可変領域: GenBank Accession No. AAA59100

[0274] 14–2. ヒト化抗体遺伝子発現ベクターの構築

分泌シグナル配列から抗体可変領域にいたるアミノ酸配列をコードする塩基配列において、50base程度の合成オリゴDNAを3'末端側が約20base程度アニールするよう交差して12本作製した。さらに、抗体可変領域遺伝子の5'末端にアニールし、XbaI切断配列を有するプライマーと抗体可変領域遺伝子の3'末端にアニールし、SfiI切断配列を有し且つインtron配列の5'末端配列をコードするプライマーを作製した。

[0275] 2.5 μMに調製した合成オリゴDNAを各1 μLで混合し、1 x TaKaRa Ex Taq Buffer, 0.4 mM dNTPs, 0.5 units TaKaRa Ex Taq(全て宝酒造)を加え、反応液48 μLになるように調製した。94°C 5分保温した後に、94°C 2分、55°C 2分、72°C 2分からなる反応を2サイクル行い、各合成オリゴDNAのアッセンブルおよび伸長反応を実施した。次に、抗体遺伝子の5'末端および3'末端側にアニールするプライマー(各10 μM)を1 μL添加し、94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 1分からなる反応を35サイクル行い、72°C 5分反応させ、抗体可変領域遺伝子を増幅した。PCR後、反応液全量を1 %アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400 bp)の増幅断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μlで溶出した。該断片をpGEM-T Easy Vector Systems (Promega)を用いて、添付説明書記載の方法でクローニングを行った。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、DNAシークエンサーABI PRISM 3730xL DNA Sequencer (Applied Biosystems)にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。

[0276] 正しいヒト化抗体可変領域遺伝子配列であることが確認されたH鎖可変領域断片挿入プラスミドをXbaIおよびSfiIで、L鎖可変領域断片挿入プラスミドをEcoRIで消化し

た後に、反応液を1%アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400 bp)のDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μlで溶出した。その後、以下のようにして動物細胞用発現ベクターを作製した。H鎖がヘテロな組み合わせであるIgG4を優先的に発現させるために、IgG1のknobs-into-hole技術(非特許文献3)を参考にIgG4のCH3部分へのアミノ酸置換体を用いた。さらにH鎖のダイマー形成促進のためにヒンジにもアミノ酸置換(—ppcpScp— →—ppcpPcp—)を導入した。ニワトリ  $\beta$  アクチングリモーターを有するpCAGGS (Niwa et al. 1991 Gene, 108: 193–199.) にY349C、T366Wに置換した定常領域遺伝子を組み込んだ発現ベクターにヒト化A69 H鎖可変領域抗体遺伝子断片を挿入し、ヒト化A69H鎖発現ベクターを作製した。また、pCAGGSにE356C、T366S、L368A、Y407Vに置換した定常領域遺伝子を組み込んだ発現ベクターにヒト化B26 H鎖可変領域抗体遺伝子断片を挿入し、ヒト化B26H鎖発現ベクターを作製した。また、pCAGGSに野生型の抗体L鎖定常領域が挿入されたプラスミド(pCAG-g κ DNA)をEco RIで消化し、ヒト化BBA L鎖可変領域抗体遺伝子断片を挿入した発現ベクターを作製した。連結反応はRapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics)を用い、大腸菌DH $5\alpha$ 株(東洋紡績)を形質転換した。

#### [0277] 14-3. ヒト化二重特異性抗体の調製

ヒト化二重特異性抗体の発現は、実施例4-2に記載した方法か以下の方法を用いて行った。ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株(Invitrogen)を10%FCS(Invitrogen)を含むDMEM培地(Invitrogen)へ懸濁し、5~6×10<sup>5</sup>個/mLの細胞密度で接着細胞用ディッシュ(直径10 cm, CORNING)の各ディッシュへ10 mLずつ蒔きこみCO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C、5% CO<sub>2</sub>)内で一昼夜培養した後に、培地を吸引除去し、6.9 mL CH O-S-SFM-II(Invitrogen)培地を添加した。14-2で調製したプラスミドDNA混合液(合計13.8 μg)を1 μg/mL Polyethylenimine (Polysciences Inc.) 20.7 μLとCHO-S-SFM II培地 690 μLと混合して室温10分間静置したものを各ディッシュの細胞へ投入し、4~5時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°Cにて5% CO<sub>2</sub>)内でインキュベートした。その後、6.9 mLのCHO-S-SFM-II培地を添加して、3日間 CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。培養上清を回収した後、遠心分離(約2000 g、5分間、室温)して細胞を除去し、

さらに0.22 μ mフィルターMILLEX<sup>(R)</sup>-GV(Millipore)を通して滅菌した。該サンプルは使用するまで4°Cで保存した。

- [0278] つづいて、実施例4-4に示す方法で抗体精製および実施例4-5に示す方法または以下に示す方法で抗体濃度の定量を実施した。BIAcore3000(BIACORE)を使用し、Sensor Chip CM5(BIACORE)にProteinAを固定化した。具体的にはメーカーのプロトコールに従い、活性化したセンサーチップに10 mM 酢酸ナトリウム水溶液(pH 4.0, BIACORE)で50 μ g/mLに希釈したProteinA溶液を5 μ L/分で30分間反応させ、その後ブロッキング操作を実施してProteinA固定化センサーチップを作製した。このセンサーチップを用いて、BIAcore Qを使用して培養上清および精製品の濃度を測定した。センサーチップの固定および濃度測定にはHBS-EP Buffer(BIACORE)を使用した。また、濃度測定時の標準品として2000 ng/mLから2倍系列でHBS-EP Bufferにて6段階希釈したヒトIgG4(ヒト型化抗TF抗体、WO 99/51743参照)を使用した。

- [0279] 14-4. ヒト化二重特異性抗体の活性評価および抗体配列の改変

調製したヒト化二重特異性抗体およびキメラ二重特異性抗体(A69/B26/BBA)の血漿凝固能を評価するために、実施例5の方法に従って、F. VIII欠乏血漿を用いてAP TTに対する抗体の影響を検討した。血液凝固能が低下したヒト化二重特異性抗体について、活性上昇を目指してヒト抗体FRのアミノ酸を改変した。また、発現分泌時にはヒト化A69/ヒト化BBA抗体、ヒト化B26/ヒト化BBA抗体、ヒト化A69/ヒト化B26/ヒト化BBA二重特異性抗体の3種類の抗体が発現するが、この3種類の抗体を分離し、二重特異性抗体のみ精製することを目的として、ヒト化A69 H鎖可変領域の等電点を下降させ、ヒト化B26 H鎖可変領域の等電点を上昇させるアミノ酸改変を行った。具体的には、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、添付説明書記載の方法でヒト化抗体可変領域に変異を導入した。目的のヒト化抗体可変領域遺伝子配列であることが確認されたH鎖可変領域断片挿入プラスミドをXbaIおよびSmaIで、L鎖可変領域断片挿入プラスミドをEcoRIで消化した後に、反応液を1%アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約400bp)のDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μ lで溶出した。その後、実施例14-2に示す方法で、動物細胞用発現ベクターを作製

した。実施例14－3に示す方法でヒト化二重特異性抗体を調製し、実施例5に示す方法で血液凝固活性を評価した。

[0280] FR配列のアミノ酸改変および血液凝固能の評価を繰り返すことでキメラ二重特異性抗体(A69/B26/BBA)と同等の活性を有するヒト化二重特異性抗体(ヒト化A69(hA69-PFL)/ヒト化B26(hB26-PF)/ヒト化BBA(hAL-AQ))を取得した(図26)。各抗体可変領域配列を以下の配列番号に示した。

(1) ヒト化A69抗体VH(hA69-PFL) 配列番号:19(塩基配列)、配列番号:20(アミノ酸配列)

(2) ヒト化B26抗体VH(hB26-PF) 配列番号:21(塩基配列)、配列番号:22(アミノ酸配列)

(3) ヒト化BBA抗体VL(hAL-AQ) 配列番号:23(塩基配列)、配列番号:24(アミノ酸配列)

[0281] [実施例15]二重特異性抗体の形成効率向上に向けた定常領域のアミノ酸改変箇所の選定

定常領域CH3界面に存在するアミノ酸を改変し、電荷的反発を利用してヘテロダイマーである二重特異性抗体の形成効率の上昇を目指して検討を行った。はじめにCH3領域の結晶構造(Protein Data bank, PDB code 1OQX)より、CH3ホモダイマー形成時に静電的相互作用を形成しているペアのアミノ酸を探査した。その結果、CH3ホモダイマー形成時の界面においては、H鎖356番目と439番目、357番目と370番目、399番目と409番目の3つのペア(番号はEUナンバーリング(Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH))が、それぞれ正電荷と負電荷を有し静電的相互作用をしていることが見出され、改変箇所として選択された。改変方法としては、ペアとなっている正電荷と負電荷のアミノ酸の電荷を入れ替える改変を施すことによって、ヘテロダイマーの形成が促進されると考えた。本制御の原理について図27に示した。また、同時にCH3界面にジスルフィド結合を導入する改変も試みた。改変したアミノ酸の箇所について表1にまとめた。

[0282] [実施例16]ヒト化二重特異性抗体の定常領域CH3界面のアミノ酸改変  
実施例15で選定されたH鎖定常領域CH3界面のアミノ酸を改変するために、以下

のような操作を行った。ヒトIgG1およびヒトIgG4のH鎖定常領域遺伝子を鋳型にしてH鎖定常領域のN末端側の2アミノ酸(Ala-Ser)をコードする塩基配列がNheI認識配列(GCTAGC)になるように設計した5'末端プライマーと3'末端にアニーリングし、かつNotI認識部位を持つように設計したプライマーを用いて各H鎖定常領域をPCR増幅し、pBluescriptKS+ベクター(東洋紡)をNheI, NotI(ともに宝酒造)で消化したベクターと連結したpBCH(IgG1定常領域遺伝子を含む)およびpBCH4(IgG4定常領域遺伝子を含む)を作製した。ヒト化A69抗体およびヒト化B26抗体のH鎖可変領域の5'末端塩基配列に相補的でコザック配列(CCACC)およびEcoRI認識配列を有するプライマーとNheI認識配列を有する3'末端塩基配列にプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をEcoRI, NheI(ともに宝酒造)で消化したpBCHまたはpBCH4に挿入して可変領域と定常領域を連結した。つづいてH鎖定常領域のCH3界面に存在するアミノ酸を改変するために、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて、添付説明書記載の方法でH鎖定常領域に変異を導入した。目的のH鎖定常領域遺伝子配列であることが確認されたH鎖遺伝子断片挿入プラスミドをEcoRIおよびNotI(ともに宝酒造)で消化した後に、反応液を1%アガローズゲル電気泳動に供した。目的のサイズ(約1400 bp)のH鎖遺伝子断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて、添付説明書記載の方法で精製し、滅菌水30 μlで溶出した。その後、EcoRIおよびNotIで消化したpCAGGSに挿入し、発現プラスミドを作製した。ヒト化二重特異性抗体の調製については、実施例14-3に示す方法に従った。改変したアミノ酸の箇所について表1にまとめた。表1の中の改変箇所番号については、EUナンバーリング(Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)を採用した。改変箇所番号の前のアルファベットは改変前のアミノ酸の一文字表記であり、改変箇所番号の後ろのアルファベットは改変後のアミノ酸の一文字表記を示している。

[0283] [表1]

	Name	ヒト化A69抗体 H鎖定常領域		ヒト化B26抗体 H鎖定常領域	
		改変箇所	アミノ酸配列番号	改変箇所	アミノ酸配列番号
IgG4	wild type	—	25	—	25
	KiH	Y349C,T366W	9	E356C,T366S,L368A,Y407V	11
	s1	R409D	26	D399K	27
	s2	K370E	28	E357K	29
	s3	K439E	30	E356K	31
	w1	R409D,K370E	32	D399K,E357K	33
	w2	R409D,K439E	34	D399K,E356K	35
	w3	K370E,K439E	36	E357K,E356K	37
	s1C	R409D,Y349C	38	D399K,S354C	39
	s2C	K370E,Y349C	40	E357K,S354C	41
	s3C	K439E,Y349C	42	E356K,S354C	43
	w3C	K370E,K439E,Y349C	44	E357K,E356K,S354C	45
	w3C2	K370E,K439E,S354C	46	E357K,E356K,Y349C	47
IgG1	wild type	—	48	—	48
	KiH	Y349C,T366W	49	D356C,T366S,L368A,Y407V	50
	w1	R409D,K370E	51	D399K,E357K	52
	w2	R409D,K439E	53	D399K,E356K	54
	w3	K370E,K439E	55	E357K,E356K	56

[0284] 上記表中、KiHは非特許文献3に記載のKnobs-into-holes技術を用いた改変体を示す。

[0285] [実施例17]CH3界面を改変した二重特異性抗体(IgG4型)の形成効率および安定性の評価

IgG4型のWild type, KiH, s1, s2, s3, w1, w2, w3, s1C, s2C, s3C, w3C2に関して、陽イオン交換クロマトグラフィー(IEX)により分析を行い二重特異性抗体(以下、BiAb)の形成効率の評価を行った。陽イオン交換クロマトグラフィー分析条件は以下のとおりであり、ヒト化A69抗体のホモダイマーであるA-Homo、ヒト化A69抗体とヒト化B26抗体のヘテロダイマーであるBiAb、ヒト化B26抗体のホモダイマーであるB-Homoのピーク面積比を算出した。

[0286] カラム:ProPac WCX-10, 4×250 mm, (Dionex)

移動相:A: 10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.25

B: 10 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mmol/L NaCl, pH 6.25

流速:1.0 mL/min

グラジエント:10%B(5 min)→(40 min)→60% B→(5 min)→100% B (5 min)

検出:220nm

[0287] Wild type, KiH, s2, s3, s1C, s2C, s3C, w3C2に関して、上述のIEX分析の際

にBiAbピークを分取することで、BiAbを精製した。BiAb画分をAmicon Ultra, MWCO 10000 (Millipore)による濃縮後、20 mM sodium acetate, 150 mM NaCl, pH 6.0に対して一晩冷所で透析を行い、その後回収し、BiAb濃度を0.1 mg/mLに統一し、イニシャルと60°C-1週間として、各々2本ずつのバイアルに分注し、60°C-1週間の安定性試験を行った。ゲルろ過クロマトグラフィー(SEC)により分析を行い、モノマーピークの残存率(60°C-1週間サンプルのモノマーピーク面積 / イニシャルサンプルのモノマーピーク面積×100)を算出した。ゲルろ過クロマトグラフィー分析条件は以下のとおりである。

[0288] カラム:Super3000 (TOSOH)

移動相:50 mM sodium phosphate, 300 mM KCl, pH 7.0

流速:0.2 ml/min

検出:220 nm

[0289] IgG4型のWild type, s1, s2, s3, w1のIEXのクロマトグラムについて図28に、Wild type, KiH, s1, s2, s3, w1, w2, w3, s1C, s2C, s3C, w3C, w3C2のA-Homo, BiAb, B-Homoの形成比率を図29に示した。また、60°C-1週間後のモノマー残存率を図30に示した。

[0290] 本実施例において見出されたCH3界面改変体は、図28、図29に示したように、いずれもwild typeと比較して、目的のBiAb形成効率が大きく向上した。CH3は定常領域にあたるため、天然のアミノ酸から改変する場合、抗原性の点から改変箇所は少ないほうが望ましい。KiHは、knobとholeを導入するための両H鎖計4箇所の改変に加えて、ジスルフィド結合導入の2箇所、合計6箇所の改変が施されている。そのため、図29に示したように高いBiAb形成効率を得ている。しかし、図30に示した安定性試験の結果から、熱安定性はwild typeと比較してジスルフィド結合を導入しているにも関わらず大きく低下している。抗体を医療用医薬品として開発するにためには、安定な製剤が必要であることから熱安定性は高いほうが望ましい。

[0291] 一方で本実施例において見出されたCH3界面改変体は、いずれもwild typeと比較して、目的のBiAb形成効率を大きく向上させることに成功した。これらの改変体のうち、例えば、s2, s3, w1, w2, w3, s1Cは、KiH(6箇所改変)よりも少ない合計2箇所あるいは

は4箇所の改変により、90%以上の高いBiAb形成効率を得ており、抗原性のリスクはより小さいと考えられる。また、図30に示した安定性試験の結果から、改変体のうち、例えば、s2, s3, w3, w3C, w3C2は、90%以上の高いBiAb形成効率、かつ、KiHよりも高い熱安定性(モノマー残存率が高い)を有しており、s3, s2c, s3C, w3C, w3C2は、wild typeよりもさらに高い熱安定性を有しており、安定な医薬品製剤を開発するには有用である。

[0292] 本実施例において、CH3界面におけるH鎖356番目、357番目、370番目、399番目、409番目、439番目のアミノ酸を改変して電荷による分子反発を導入することによって、目的のBiAb形成効率が大きく向上できることを見出した。また、これらの単独、組み合わせ、およびジスルフィド結合を導入することによって、KiHよりも少ない改変でBiAb形成効率が大きく向上できること、および、KiHより高い安定性、さらにはwild typeよりも高い熱安定性でBiAb形成効率が大きく向上できることを見出した。

[0293] [実施例18]CH3界面を改変した二重特異性抗体の凝固活性の評価

実施例16において精製されたCH3界面を改変したIgG4型の二重特異性抗体(s1, s2, s3, w1, w2, w3)を用いて、実施例5に示す方法に従って凝固活性を評価した。図31に示すとおり定常領域CH3界面のアミノ酸を改変しても凝固活性は変化しないことから、CH3界面のアミノ酸改変は抗原との反応に関与する可変領域の構造に影響を与えないことが示された。

[0294] [実施例19]CH3界面を改変した二重特異性抗体(IgG1型)の形成効率の評価

IgG1型のWild type, KiH, w1, w2, w3に関して、陽イオン交換クロマトグラフィー(IEX)により分析を行いBiAb形成効率の評価を行った。陽イオン交換クロマトグラフィー分析条件は以下のとおりであり、ヒト化A69抗体のホモダイマーであるA-Homo、ヒト化A69抗体ヒト化B26抗体のヘテロダイマーであるBiAb、ヒト化B26抗体のホモダイマーであるB-Homoのピーク面積比を算出した。

[0295] カラム:ProPac WCX-10, 4×250 mm, (Dionex)

移動相:A: 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.25

B: 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mmol/L NaCl, pH 6.25

流速:1.0 mL/min

グラジエント:10%B(5 min)→(40 min)→60% B→(5 min)→100% B (5 min)

検出:220nm

[0296] IgG1型のWild type, KiH, w1, w2, w3のA-Homo, BiAb, B-Homoの形成比率を図3-2に示した。IgG4型と同様に、いずれもwild typeと比較して、目的のBiAb形成効率が大きく向上した。IgG4型と同様に、KiHよりも少ない4箇所の改変により、90%以上の高いBiAb形成効率を得ており、抗原性のリスクはより小さいと考えられる。本実施例において、CH3界面におけるH鎖356番目、357番目、370番目、399番目、409番目、439番目のアミノ酸を改変する方法は、抗体定常領域のサブクラスがIgG4だけでなくIgG1にも適用可能であり、IgG抗体全般に応用できることが見出された。

### 産業上の利用可能性

[0297] 本発明の方法においては、アミノ酸の置換数が少數でよいことから、元のポリペプチドの構造・機能(活性)を変化させることなく、会合を制御させることが可能であり、非常に有用性が高い。また、抗原性への影響も少ない。  
本発明の方法を用いることにより、実際に活性を保持する二重特異性抗体の効率的な取得が可能である。

## 請求の範囲

- [1] ポリペプチドの会合が制御されるようにポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基に変異を有するポリペプチドの製造方法であって、(a)ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を、ポリペプチド内の会合が阻害されるように元の核酸から改変し、(b)宿主細胞を該核酸が発現するように培養し、(c)宿主細胞培養物から該ポリペプチドを回収することを含むポリペプチド変異体の製造方法。
- [2] 異種多量体の会合が制御されるようにポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基に変異を有する異種多量体の製造方法であって、(a)ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を、ポリペプチド間の会合が阻害されるように元の核酸から改変し、(b)宿主細胞を該核酸が発現するように培養し、(c)宿主細胞培養物から該異種多量体を回収することを含む異種多量体の製造方法。
- [3] 2種以上の構造異性体を形成し得るポリペプチドにおいて、1種以上の構造異性体を形成するポリペプチドの会合が阻害されるように、ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を元の核酸から改変する請求項1に記載の方法。
- [4] 2種以上の多量体を形成し得る異種多量体において、1種以上の多量体を形成するポリペプチド間の会合が阻害されるように、ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を元の核酸から改変する請求項2に記載の方法。
- [5] 工程(a)の改変が、界面を形成する2残基以上のアミノ酸残基が同種の電荷となるように該界面にアミノ酸残基の変異が導入されるように、元の核酸を改変することである、請求項1または2に記載の方法。
- [6] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である請求項5に記載の方法。
- [7] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である請求項5に記載の方法。
- [8] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である請求項5に記載の方法。
- [9] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である請求項5に記載の方法。
- [10] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である請求項5に記載の方法。
- [11] 工程(a)の改変が、界面に存在する疎水性コアを形成するアミノ酸残基が電荷を有するアミノ酸残基となるように該界面にアミノ酸残基の変異が導入されるように、元の核酸を改変することである、請求項1または2に記載の方法。

- [12] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である請求項11に記載の方法。
- [13] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である請求項11に記載の方法。
- [14] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である請求項11に記載の方法。
- [15] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である請求項11に記載の方法。
- [16] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である請求項11に記載の方法。
- [17] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域により形成される請求項1または2に記載の方法。
- [18] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖可変領域により形成される請求項1または2に記載の方法。
- [19] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域により形成される請求項1または2に記載の方法。
- [20] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖定常領域により形成される請求項1または2に記載の方法。
- [21] ポリペプチドが、2つ以上の重鎖可変領域と2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合した一本鎖ポリペプチドである請求項1に記載の方法。
- [22] 異種多量体が、2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む多重特異性抗体である請求項2に記載の方法。
- [23] 異種多量体が、二重特異性抗体である請求項22に記載の方法。
- [24] 請求項1または2に記載の方法により製造されるポリペプチド変異体または異種多量体。
- [25] ポリペプチド変異体であって、元のポリペプチド内の会合が阻害されるように、該ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基の改変を有するポリペプチド変異体。
- [26] 異種多量体であって、元のポリペプチド間の会合が阻害されるように、該ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基の改変を有する異種多量体。
- [27] 元のポリペプチドが2種以上の構造異性体を形成し得る、請求項25に記載のポリペプチド変異体。
- [28] 元のポリペプチドが2種以上の多量体を形成し得る、請求項26に記載の異種多量体。

- [29] 前記ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面を形成する2残基以上のアミノ酸残基が同種の電荷となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入することである、請求項25に記載のポリペプチド変異体または請求項26に記載の異種多量体。
- [30] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である請求項29に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。
- [31] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である請求項29に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。
- [32] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である請求項29に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。
- [33] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である請求項29に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。
- [34] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である請求項29に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。
- [35] 前記ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面に存在する疎水性コアを形成するアミノ酸残基が電荷を有するアミノ酸残基となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入することである請求項25に記載のポリペプチド変異体または請求項26に記載の異種多量体。
- [36] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である請求項35に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。
- [37] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である請求項35に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。
- [38] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である請求項35に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。
- [39] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である請求項35に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。
- [40] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である請求項35に記載のポリペプチド変異体または異種多量体。

- [41] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域により形成される請求項25に記載のポリペプチド変異体または請求項26に記載の異種多量体。
- [42] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖可変領域により形成される請求項25に記載のポリペプチド変異体または請求項26に記載の異種多量体。
- [43] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域により形成される請求項25に記載のポリペプチド変異体または請求項26に記載の異種多量体。
- [44] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖定常領域により形成される請求項25に記載のポリペプチド変異体または請求項26に記載の異種多量体。
- [45] ポリペプチドが、2つ以上の重鎖可変領域と2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合した一本鎖ポリペプチドである請求項25に記載のポリペプチド変異体。
- [46] 異種多量体が、2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む多重特異性抗体である請求項26に記載の異種多量体。
- [47] 異種多量体が、二重特異性抗体である請求項46に記載の異種多量体。
- [48] 請求項25に記載のポリペプチド変異体または請求項26に記載の異種多量体、および医薬的に許容される担体を含む組成物。
- [49] 請求項25に記載のポリペプチド変異体または請求項26に記載の異種多量体をコードする核酸。
- [50] 請求項49に記載の核酸を有する宿主細胞。
- [51] 請求項50に記載の宿主細胞を培養する工程、細胞培養物からポリペプチドを回収する工程を含む請求項25に記載のポリペプチド変異体または請求項26に記載の異種多量体の製造方法。
- [52] ポリペプチドの会合制御方法であって、ポリペプチド内の会合が阻害されるように、元のポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基を改変することを含むポリペプチドの会合制御方法。
- [53] 異種多量体の会合制御方法であって、ポリペプチド間の会合が阻害されるように、元のポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基を改変することを含む異種多量体の会合制御方法。
- [54] 2種以上の構造異性体を形成し得るポリペプチドにおいて、1種以上の構造異性体

を形成するポリペプチドの会合が阻害されるように、ポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基を改変する請求項52に記載の方法。

- [55] 2種以上の多量体を形成し得る異種多量体において、1種以上の多量体を形成するポリペプチド間の会合が阻害されるように、ポリペプチド間の界面を形成するアミノ酸残基を改変する請求項53に記載の方法。
- [56] 前記ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面を形成する2残基以上のアミノ酸残基が同種の電荷となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入することである、請求項52または53に記載の方法。
- [57] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である請求項56に記載の方法。
- [58] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である請求項56に記載の方法。
- [59] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である請求項56に記載の方法。
- [60] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である請求項56に記載の方法。
- [61] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である請求項56に記載の方法。
- [62] 前記ポリペプチドの界面を形成するアミノ酸残基の改変が、界面に存在する疎水性コアを形成するアミノ酸残基が電荷を有するアミノ酸残基となるように該界面にアミノ酸残基の変異を導入することである、請求項52または53に記載の方法。
- [63] 導入されるアミノ酸残基がグルタミン酸(E)である請求項62に記載の方法。
- [64] 導入されるアミノ酸残基がアスパラギン酸(D)である請求項62に記載の方法。
- [65] 導入されるアミノ酸残基がリジン(K)である請求項62に記載の方法。
- [66] 導入されるアミノ酸残基がアルギニン(R)である請求項62に記載の方法。
- [67] 導入されるアミノ酸残基がヒスチジン(H)である請求項62に記載の方法。
- [68] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域により形成される請求項52または53に記載の方法。
- [69] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖可変領域により形成される請求項52または53に記載の方法。
- [70] ポリペプチドの界面が、抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域により形成される請求項52または53に記載の方法。
- [71] ポリペプチドの界面が、2種以上の重鎖定常領域により形成される請求項52または

53に記載の方法。

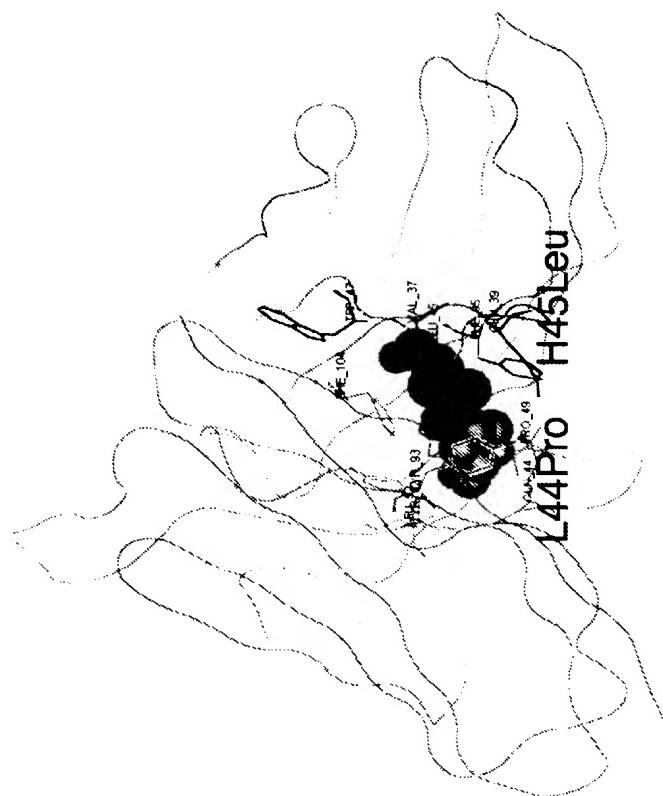
- [72] ポリペプチドが、2つ以上の重鎖可変領域と2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合した一本鎖ポリペプチドである請求項52に記載の方法。
- [73] 異種多量体が、2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む多重特異性抗体である請求項53に記載の方法。
- [74] 異種多量体が、二重特異性抗体である請求項73に記載の方法。
- [75] 重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体であって、以下の(1)および(2)のアミノ酸残基が同種の電荷を有するアミノ酸残基である抗体。
- (1) 重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における39位に相当するアミノ酸残基
- (2) 軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における44位に相当するアミノ酸残基
- [76] 重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体であって、以下の(1)および(2)のアミノ酸残基が同種の電荷を有するアミノ酸残基である抗体。
- (1) 重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基
- (2) 軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における50位に相当するアミノ酸残基
- [77] 重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体であって、以下の(1)または(2)のいずれか一方が電荷を有するアミノ酸残基である抗体。
- (1) 重鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:6に記載のアミノ酸配列における45位に相当するアミノ酸残基
- (2) 軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸残基であって、配列番号:8に記載のアミノ酸配列における50位に相当するアミノ酸残基
- [78] 前記同種の電荷を有するアミノ酸残基が、以下の(a)または(b)いずれかの群に含まれるアミノ酸残基から選択される請求項75または76に記載の抗体:
- (a) グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D);
- (b) リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)。

- [79] 前記電荷を有するアミノ酸残基が、グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)、リジン(K)、アルギニン(R)またはヒスチジン(H)である請求項77に記載の抗体。
- [80] ポリペプチドが、2つ以上の重鎖可変領域と2つ以上の軽鎖可変領域をリンカーで結合した一本鎖ポリペプチドである請求項75～77のいずれか1項に記載の抗体。
- [81] ポリペプチドが、2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む多重特異性抗体である請求項75～77のいずれか1項に記載の抗体。
- [82] ポリペプチドが、二重特異性抗体である請求項81に記載の抗体。
- [83] 請求項75～77のいずれか1項に記載の抗体および医薬的に許容される担体を含む組成物。
- [84] 請求項75～77のいずれか1項に記載の抗体を構成するポリペプチドをコードする核酸。
- [85] 請求項84に記載の核酸を有する宿主細胞。
- [86] 請求項85に記載の宿主細胞を培養する工程、細胞培養物からポリペプチドを回収する工程を含む請求項75～77のいずれか1項に記載の抗体の製造方法。
- [87] 2種以上の重鎖CH3領域を含む抗体であって、第1の重鎖CH3領域における以下の(1)～(3)に示すアミノ酸残基の組から選択される1組ないし3組のアミノ酸残基が同種の電荷を有する抗体。  
(1) 重鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバーリングによる356位および439位のアミノ酸残基  
(2) 重鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバーリングによる357位および370位のアミノ酸残基  
(3) 重鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバーリングによる399位および409位のアミノ酸残基
- [88] 第2の重鎖CH3領域における前記(1)～(3)に示すアミノ酸残基の組から選択されるアミノ酸残基の組であって、前記第1の重鎖CH3領域において同種の電荷を有する前記(1)～(3)に示すアミノ酸残基の組に対応する1組ないし3組のアミノ酸残基が、前記第1の重鎖CH3領域における対応するアミノ酸残基とは反対の電荷を有する請求項87に記載の抗体。

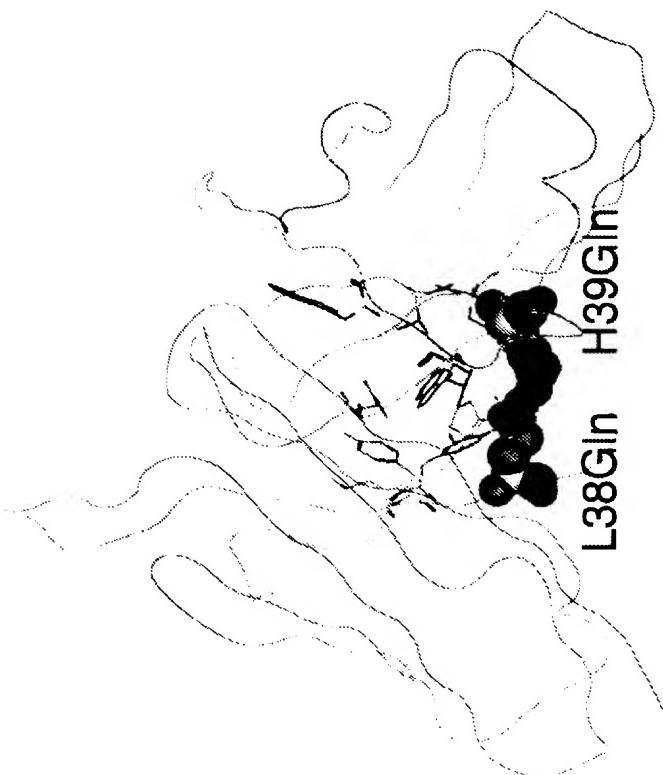
- [89] 前記同種の電荷を有するアミノ酸残基が、以下の(a)または(b)いずれかの群に含まれるアミノ酸残基から選択される請求項87に記載の抗体：
- (a) グルタミン酸(E)、アスパラギン酸(D)；
- (b) リジン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)。
- [90] 前記第1の重鎖CH3領域と第2の重鎖CH3領域がジスルフィド結合により架橋している請求項87に記載の抗体。
- [91] 2種以上の重鎖定常領域を有する抗体である請求項87に記載の抗体。
- [92] 2種以上の重鎖可変領域と2種以上の軽鎖可変領域を含む多重特異性抗体である請求項87に記載の抗体。
- [93] 二重特異性抗体である請求項92に記載の抗体。
- [94] 請求項87に記載の抗体および医薬的に許容される担体を含む組成物。
- [95] 請求項87に記載の抗体を構成するポリペプチドをコードする核酸。
- [96] 請求項95に記載の核酸を有する宿主細胞。
- [97] 請求項96に記載の宿主細胞を培養する工程、細胞培養物からポリペプチドを回収する工程を含む請求項87に記載の抗体の製造方法。

[図1]

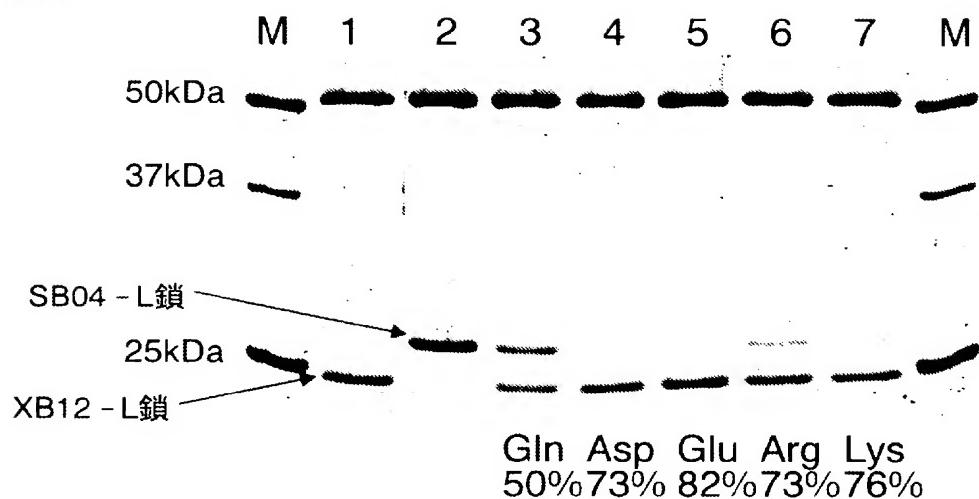
(B)



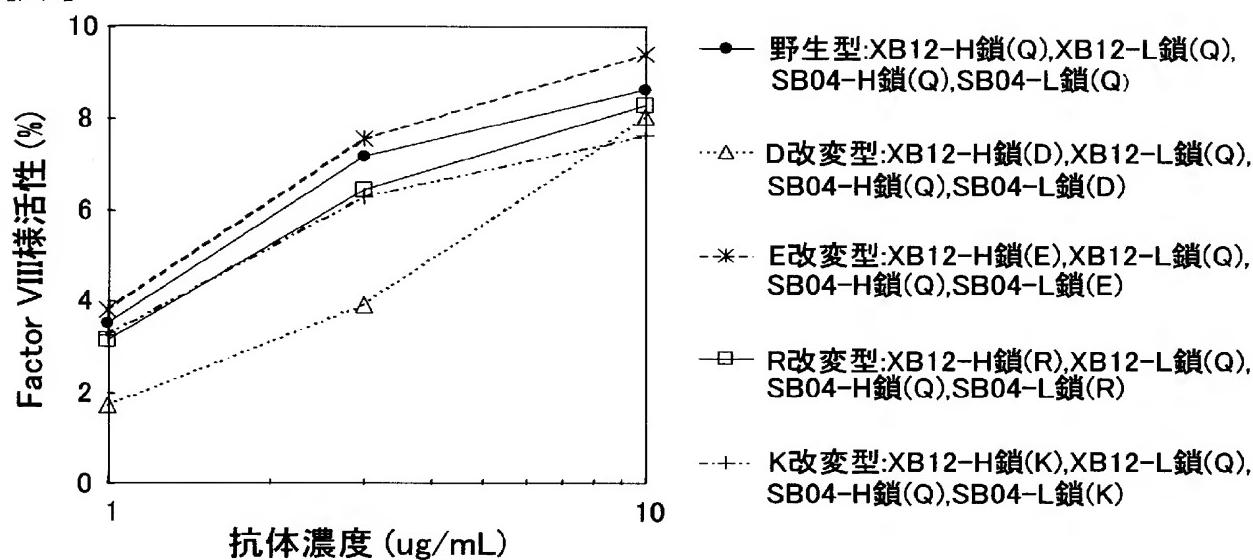
(A)



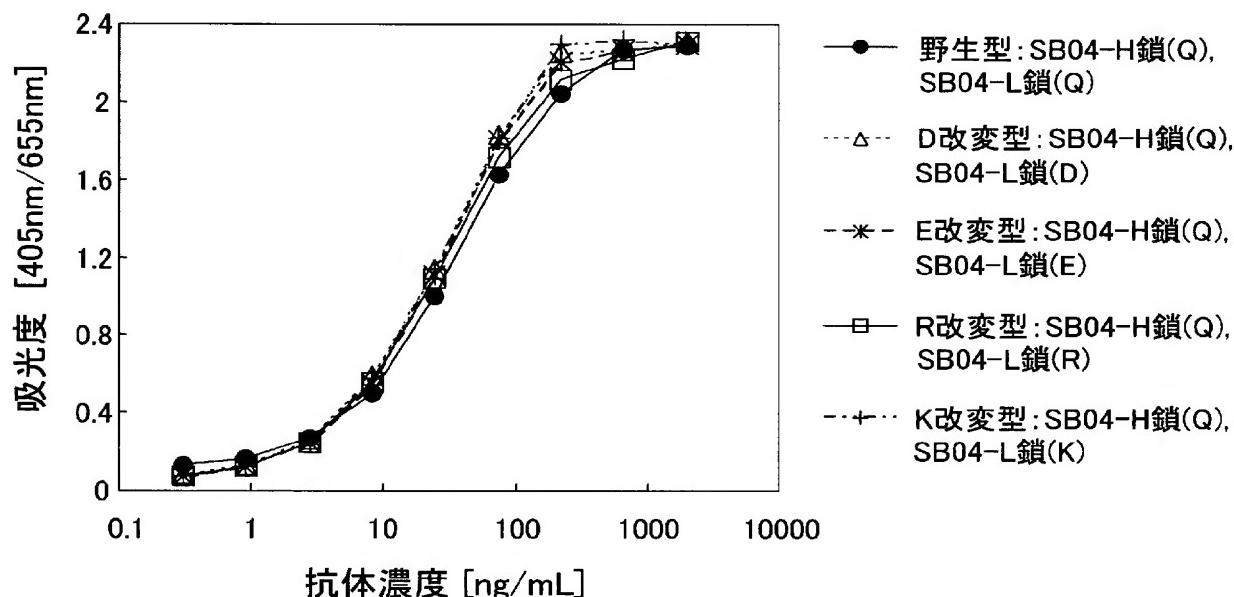
[図2]



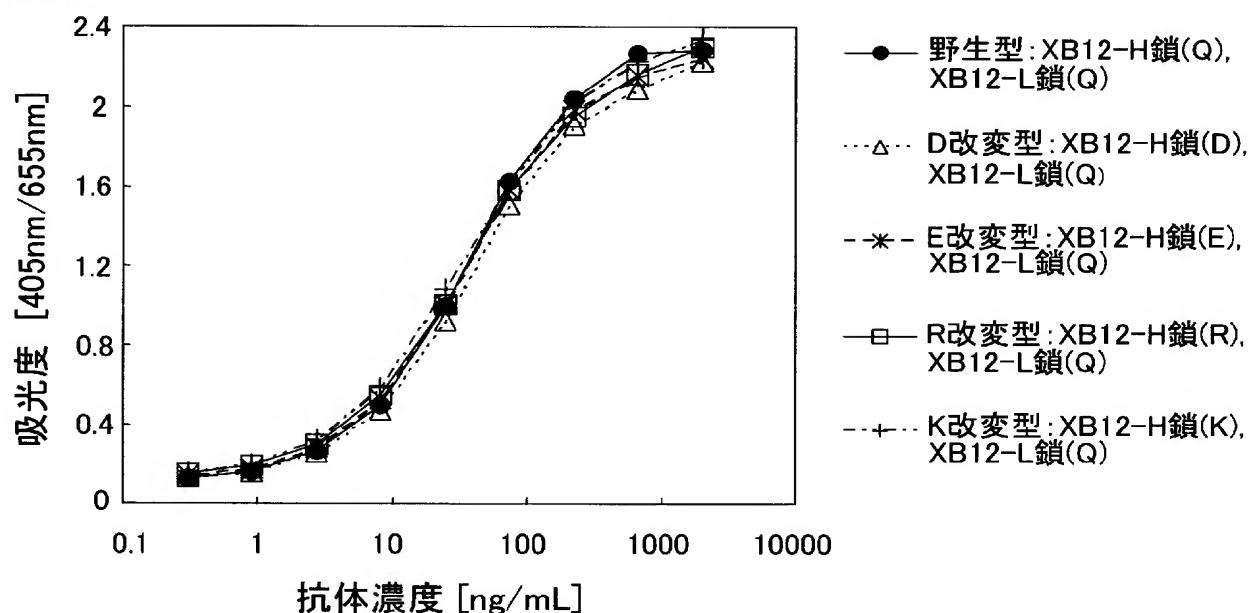
[図3]



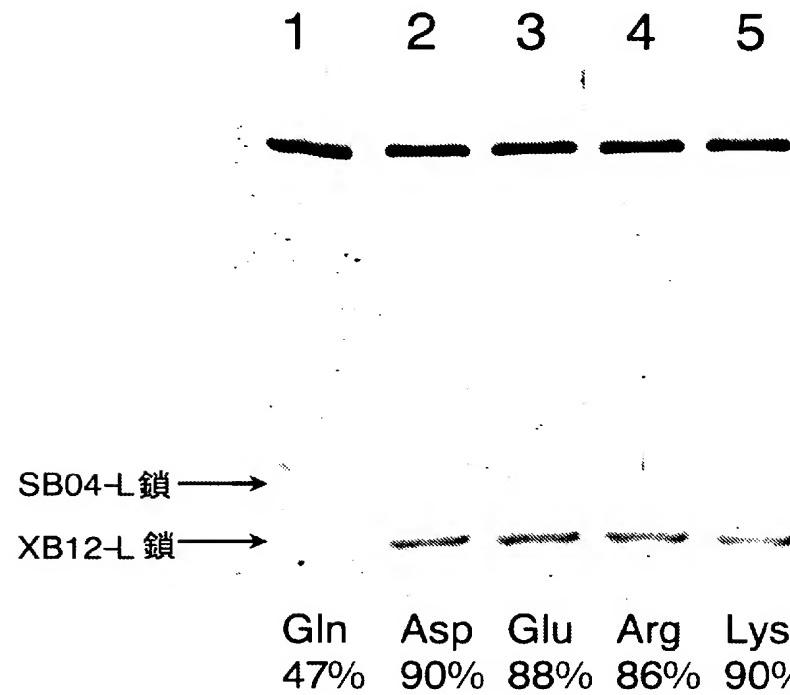
[図4]



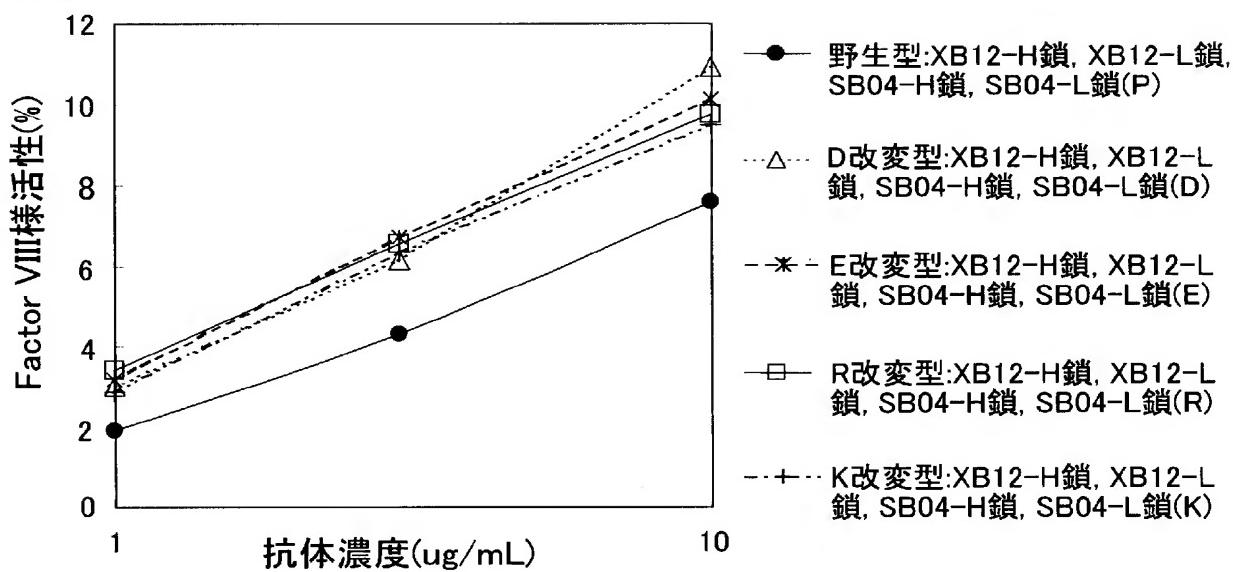
[図5]



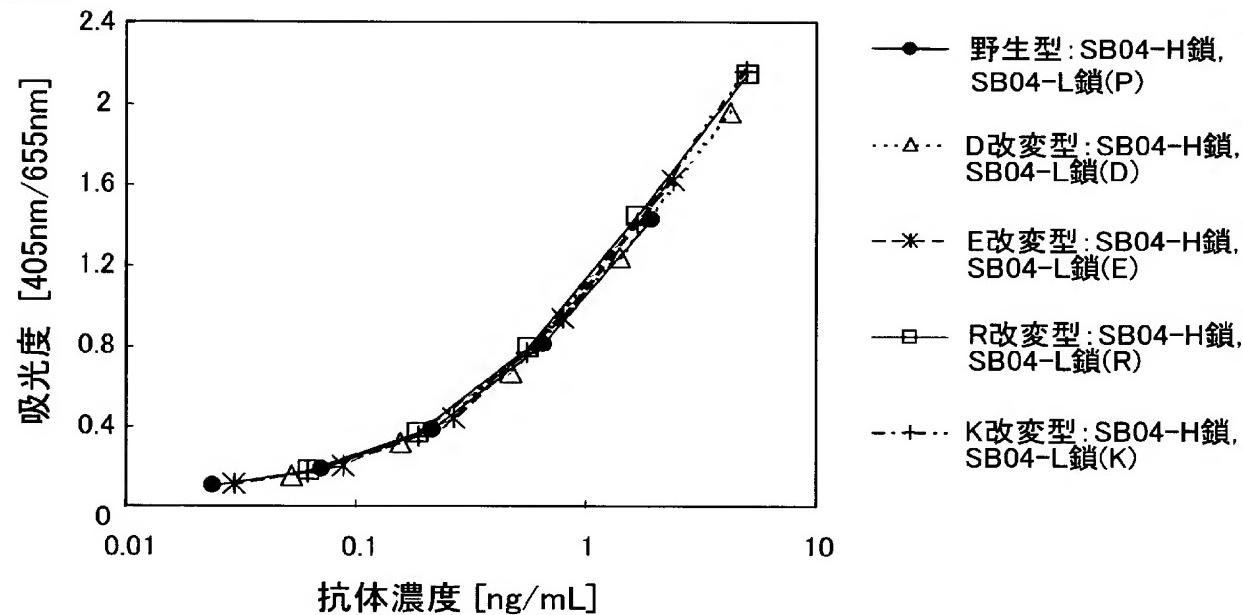
[図6]



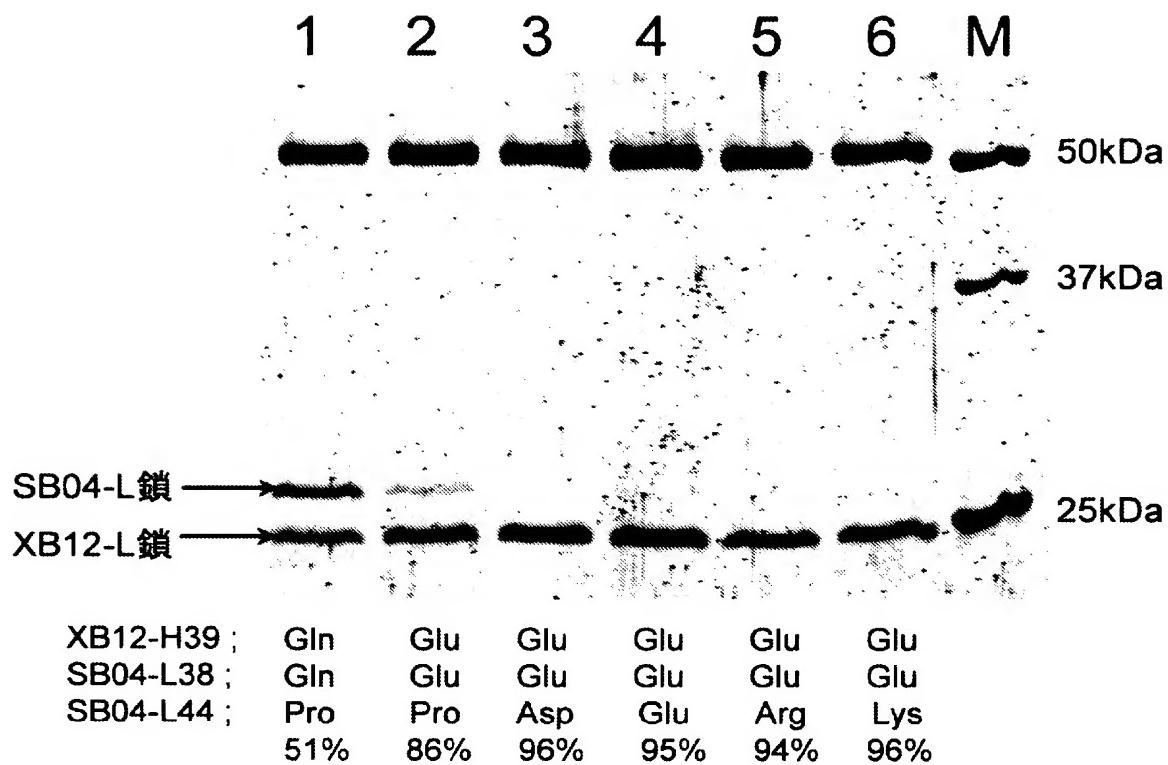
[図7]



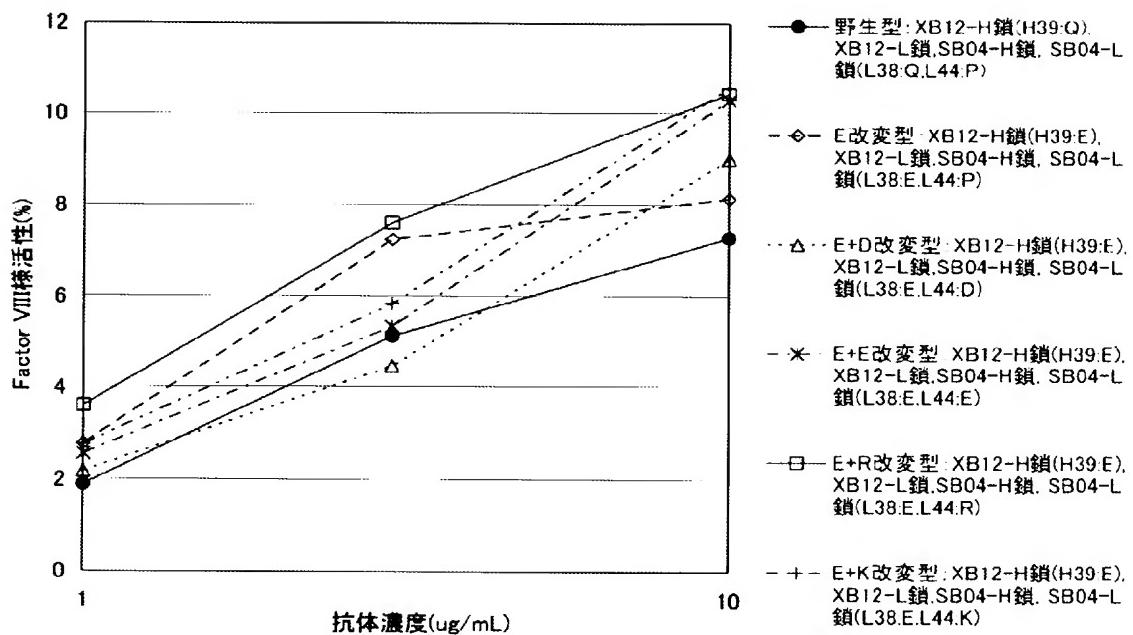
[図8]



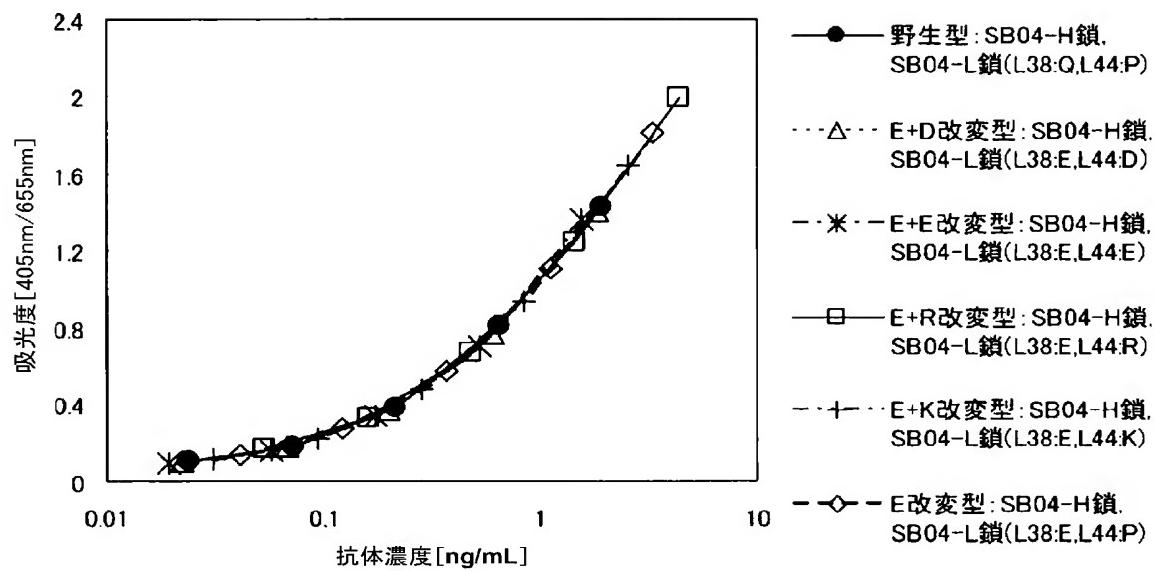
[図9]



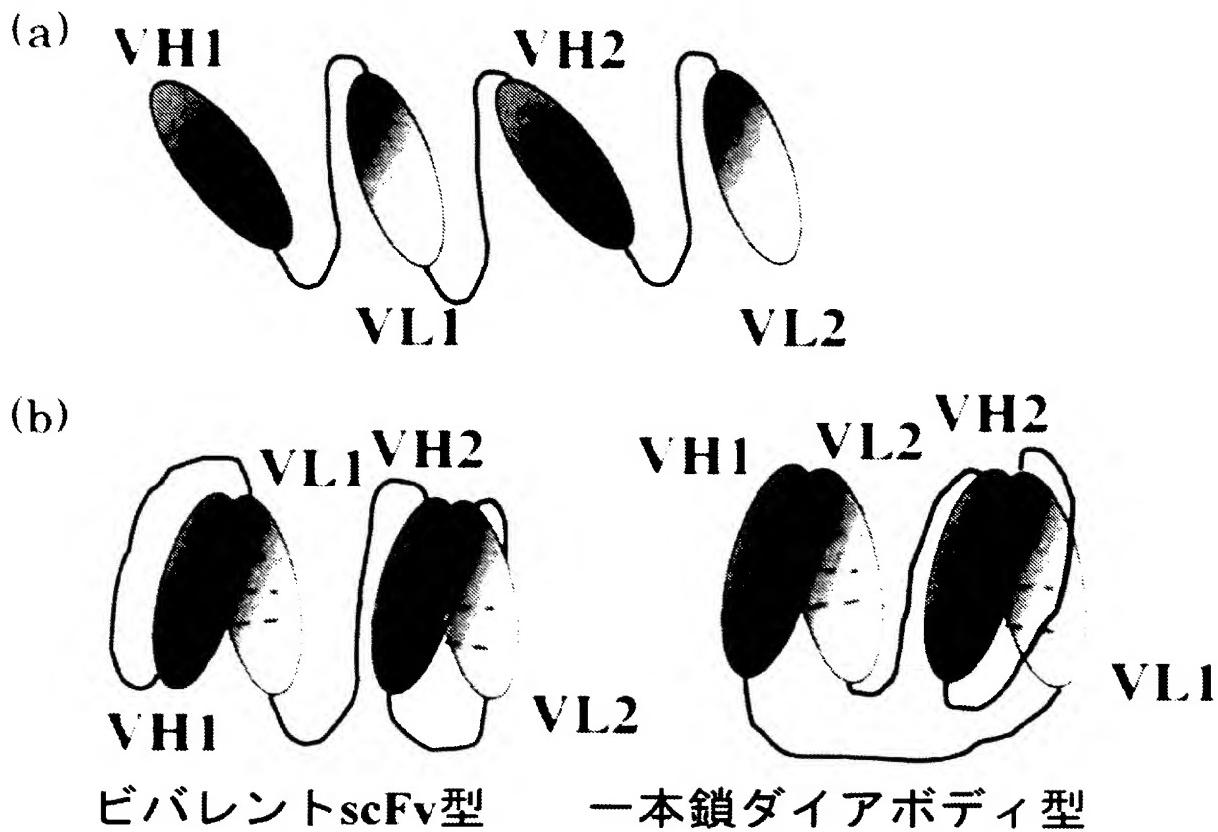
[図10]



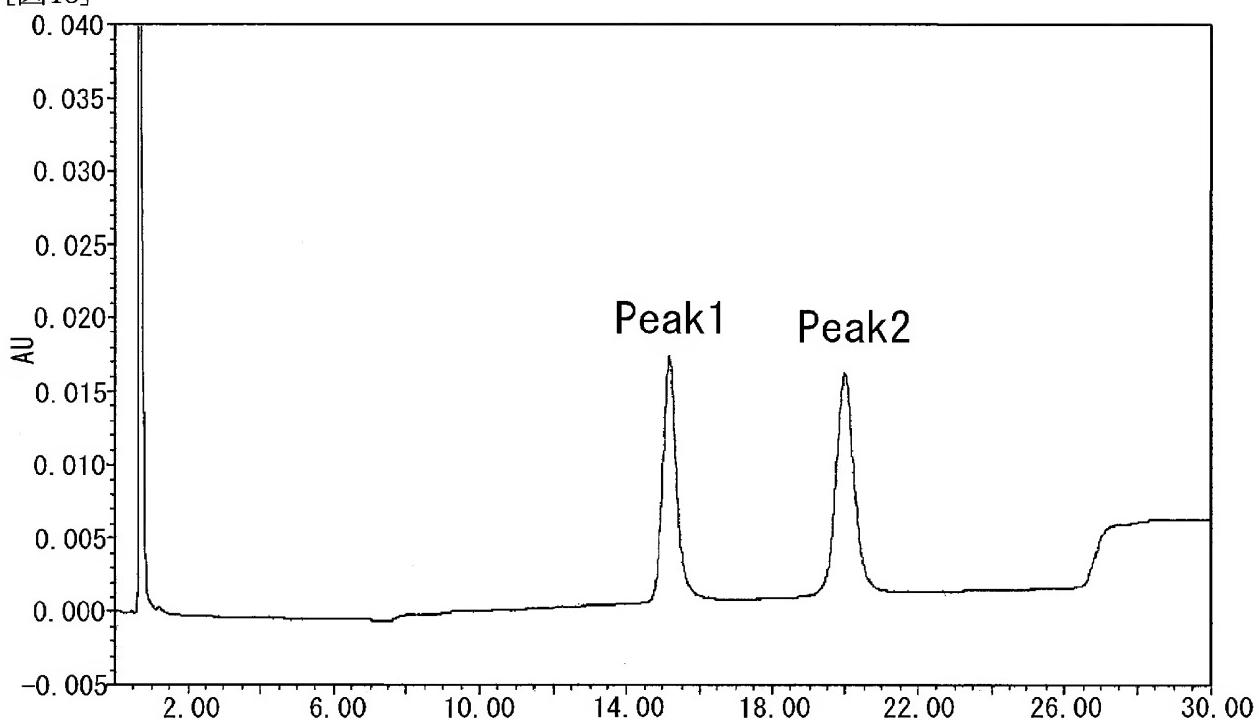
[図11]



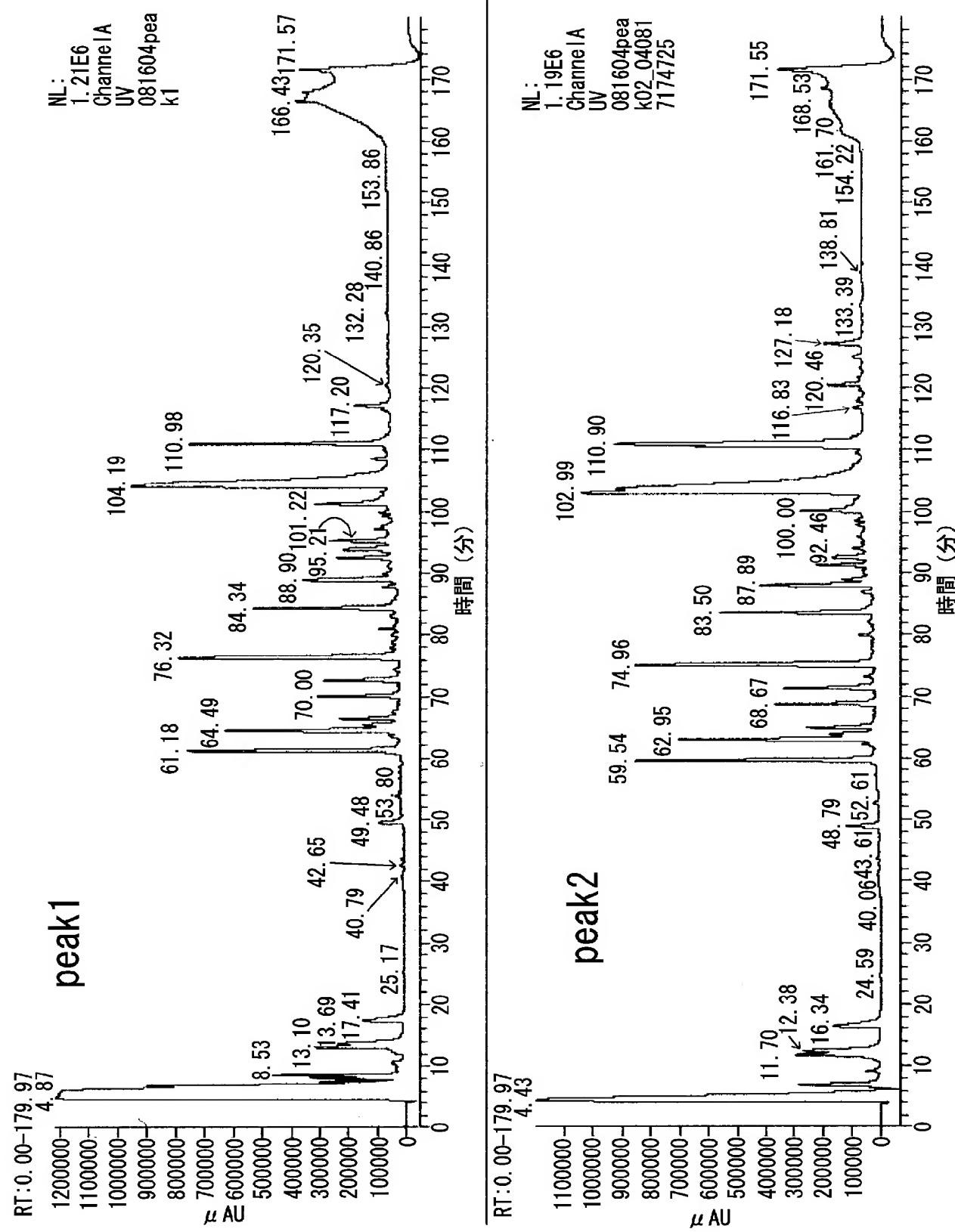
[図12]



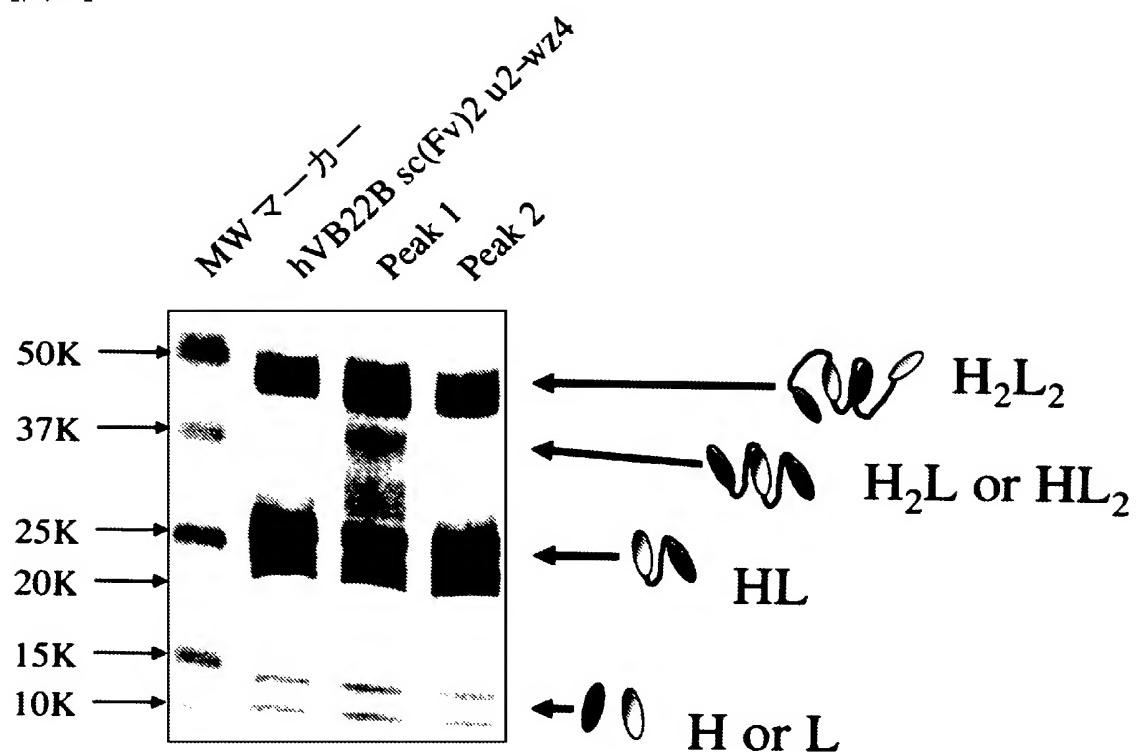
[図13]



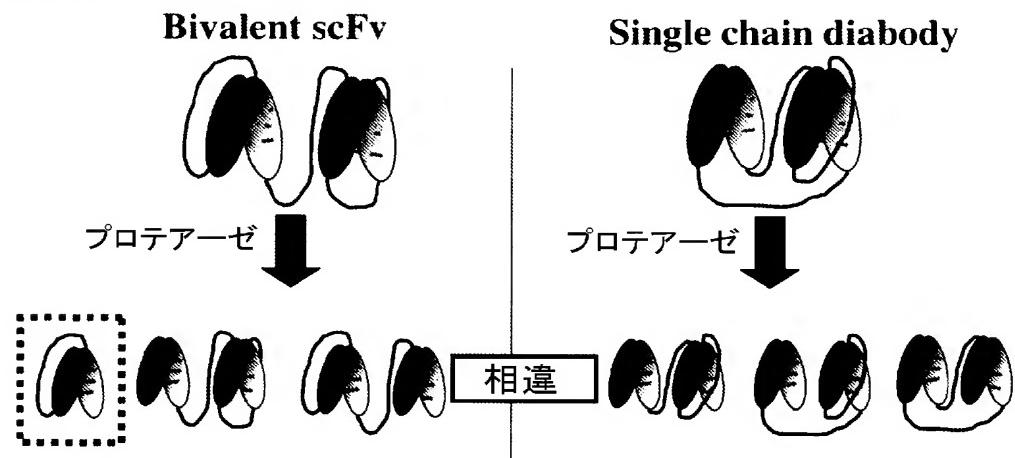
[図14]



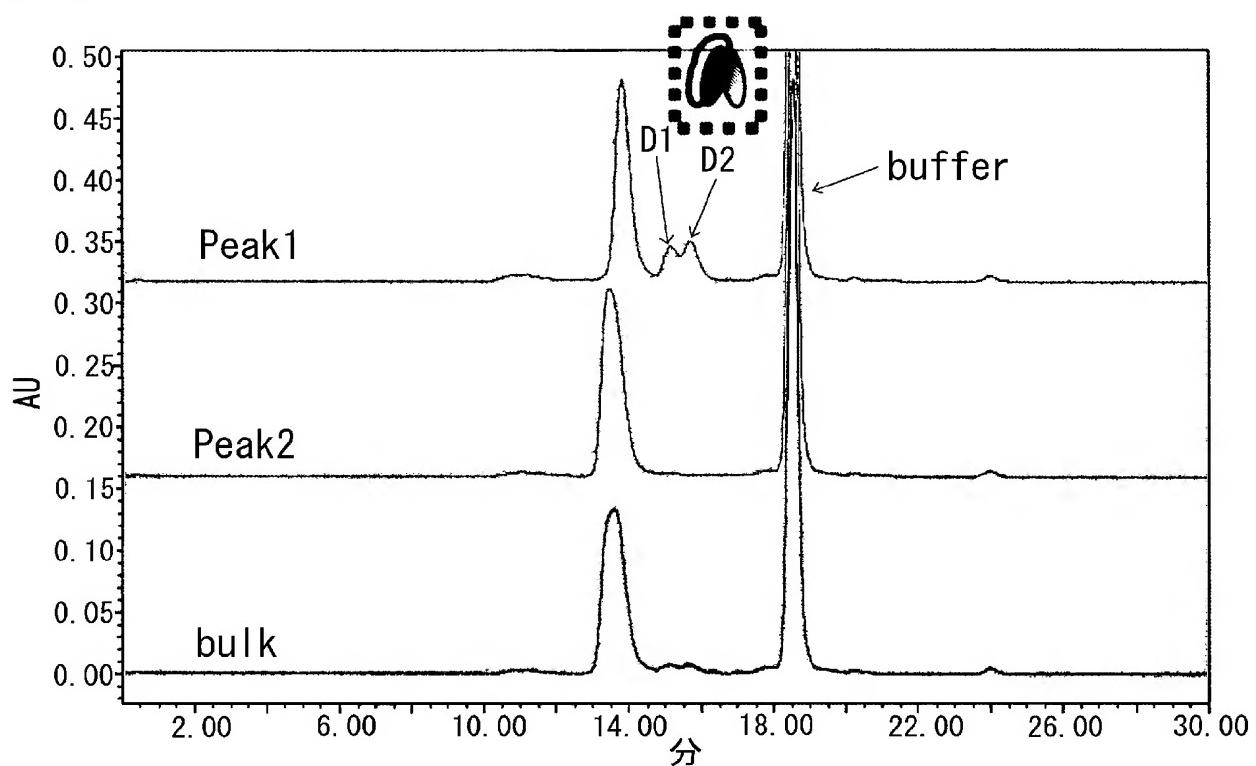
[図15]



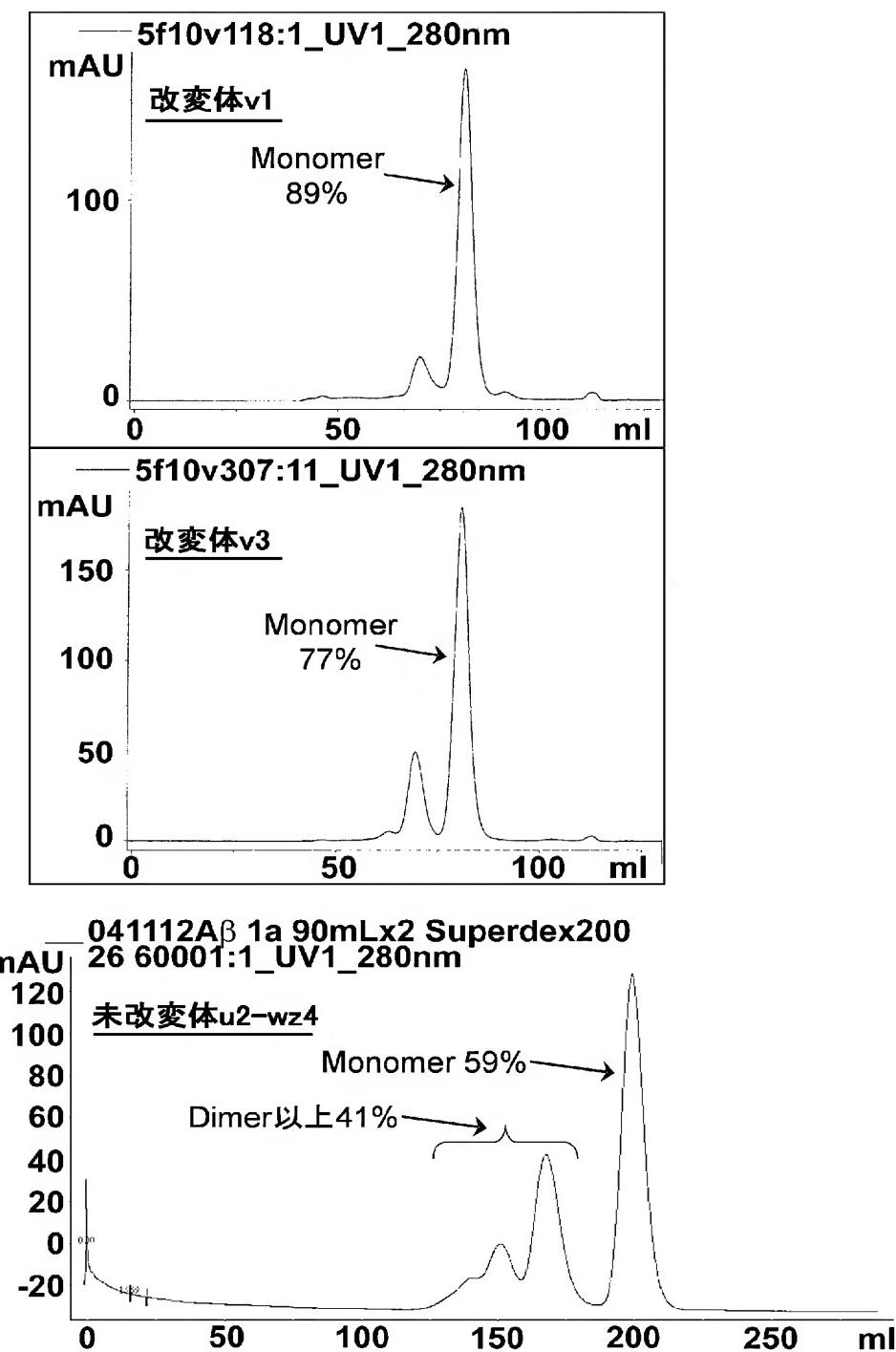
[図16]



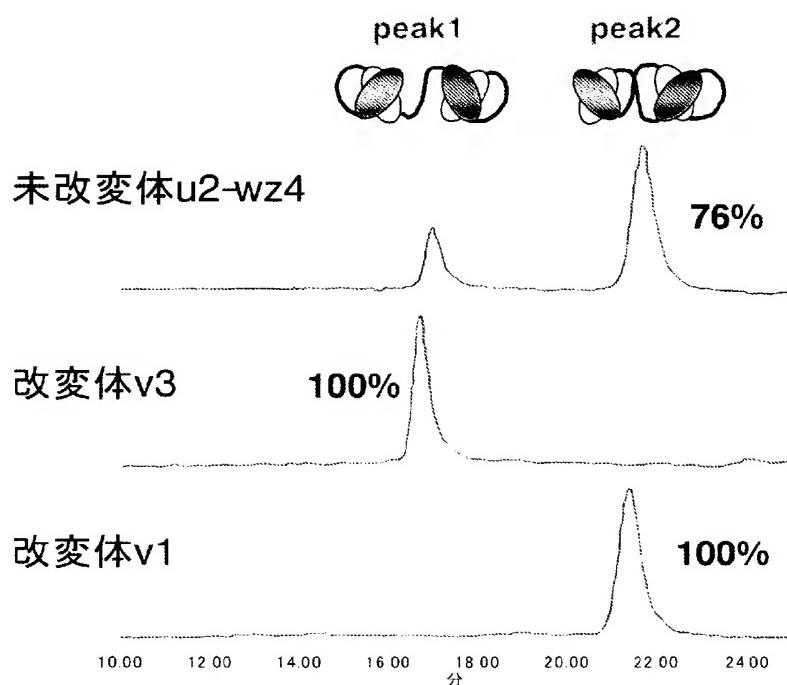
[図17]



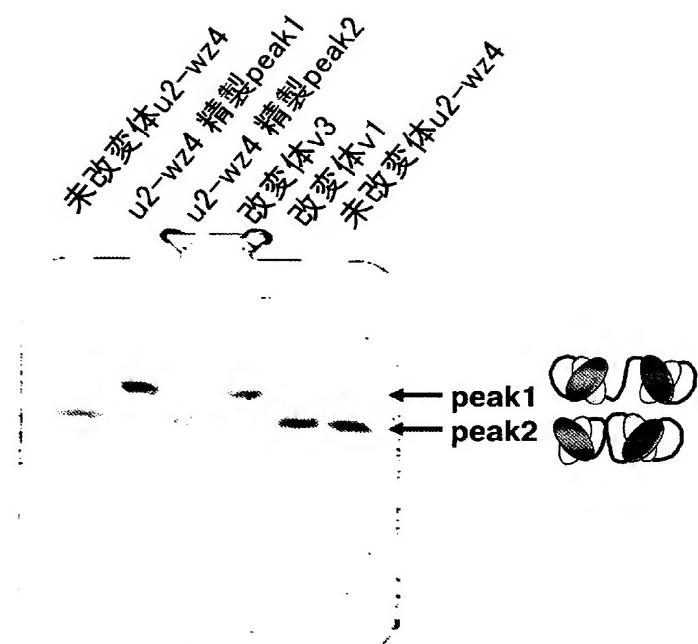
[図18]



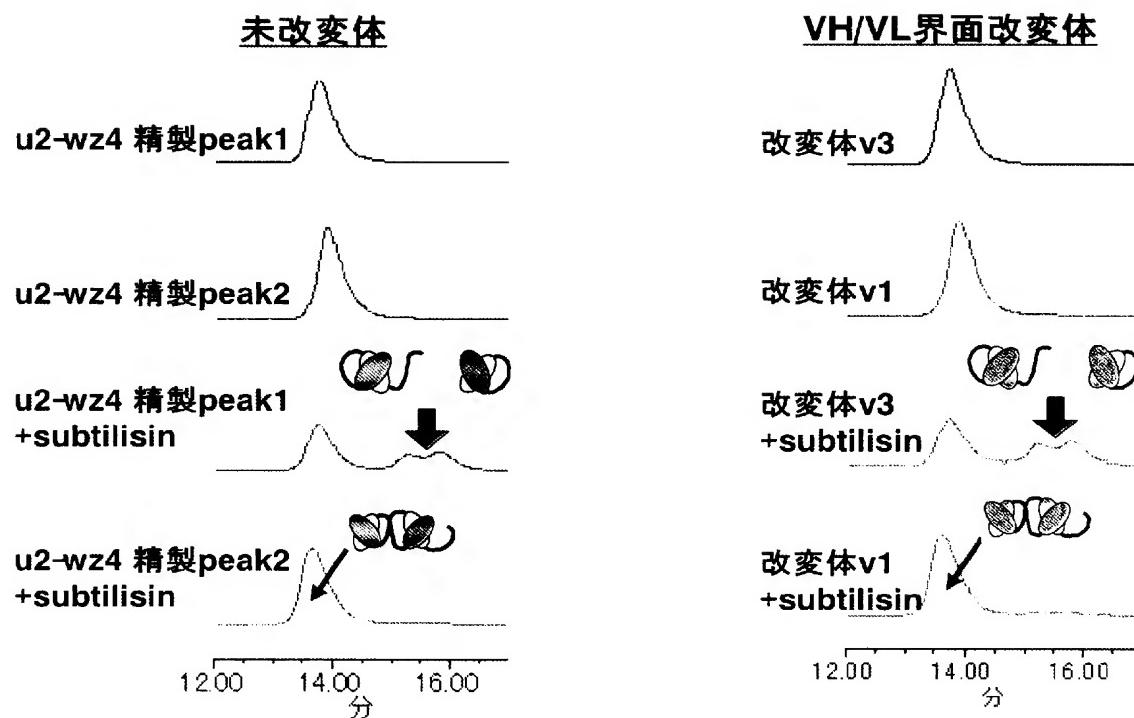
[図19]



[図20]

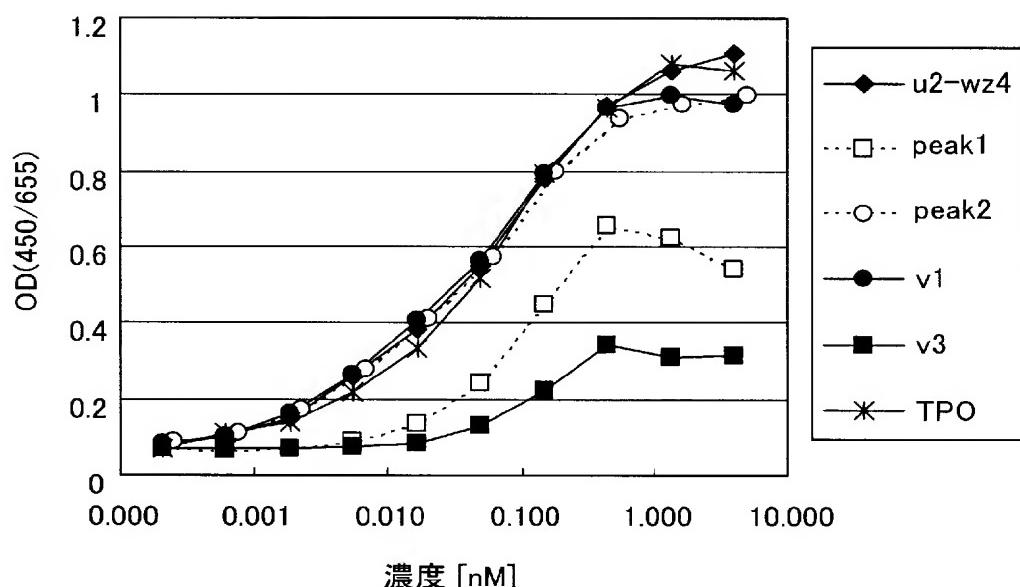


[図21]

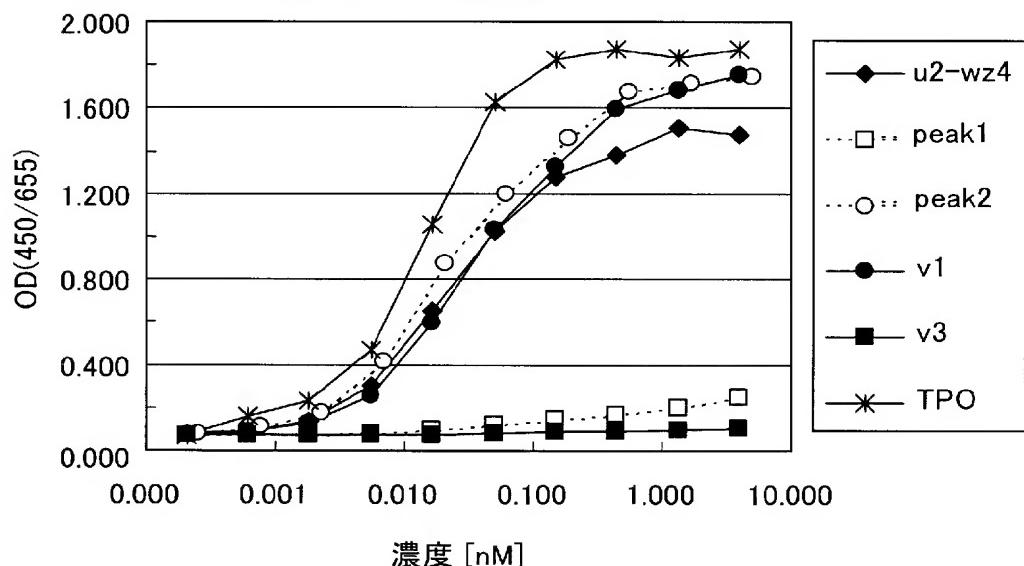


[図22]

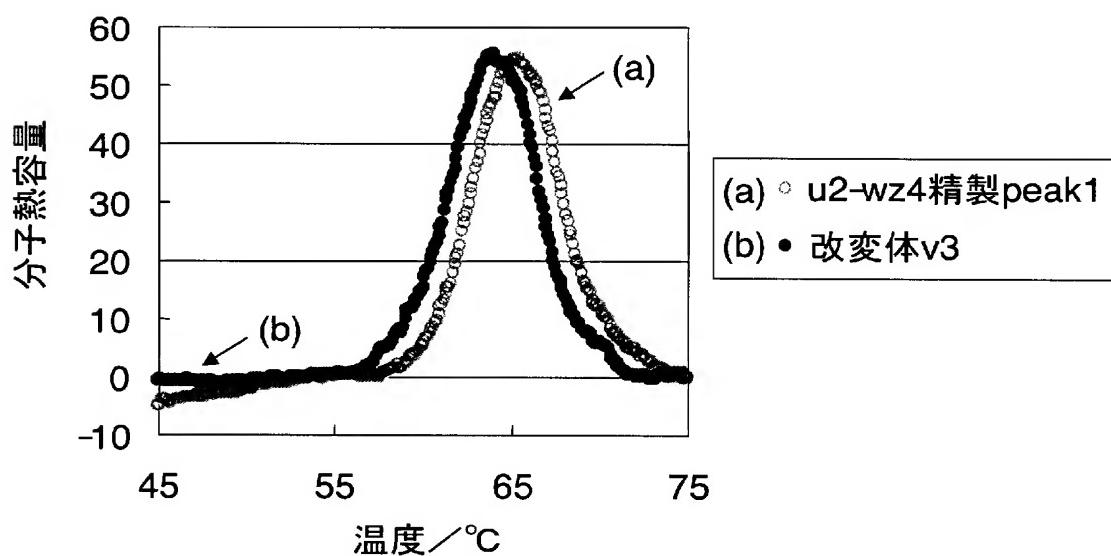
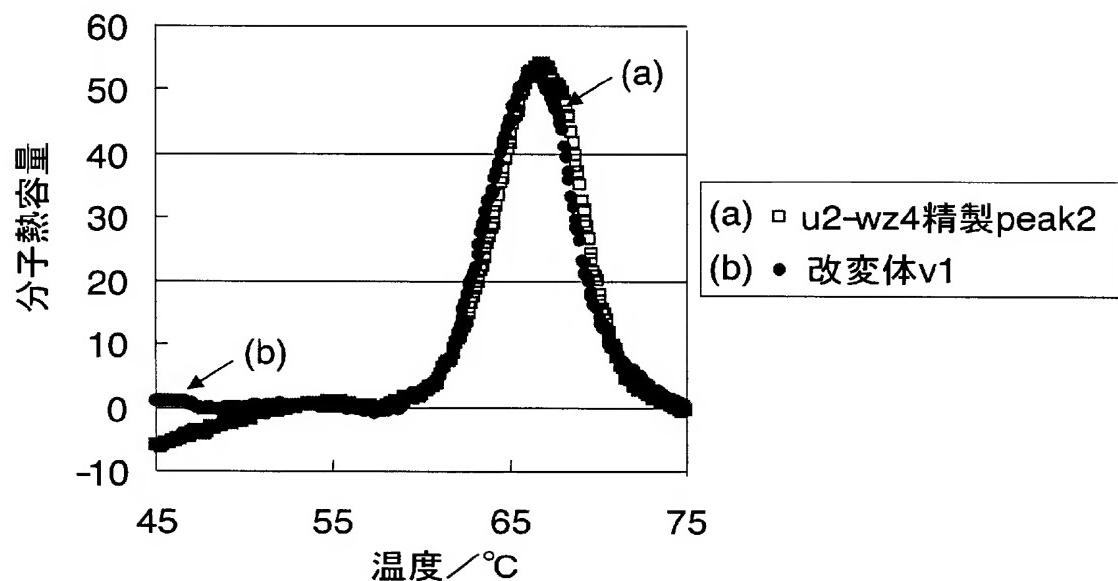
(A) BaF-human Mpl



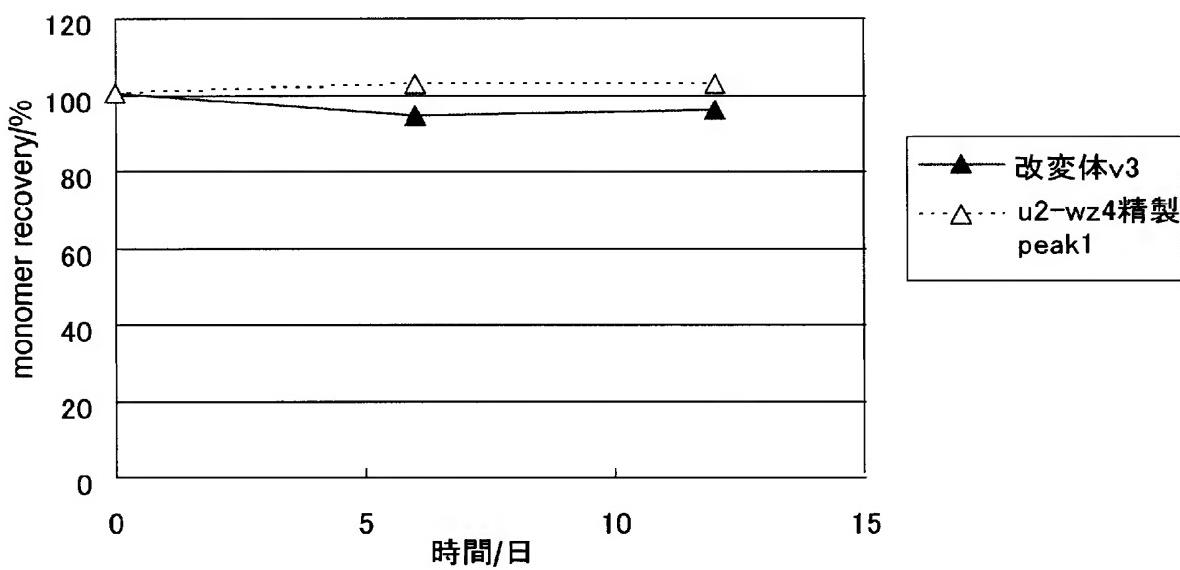
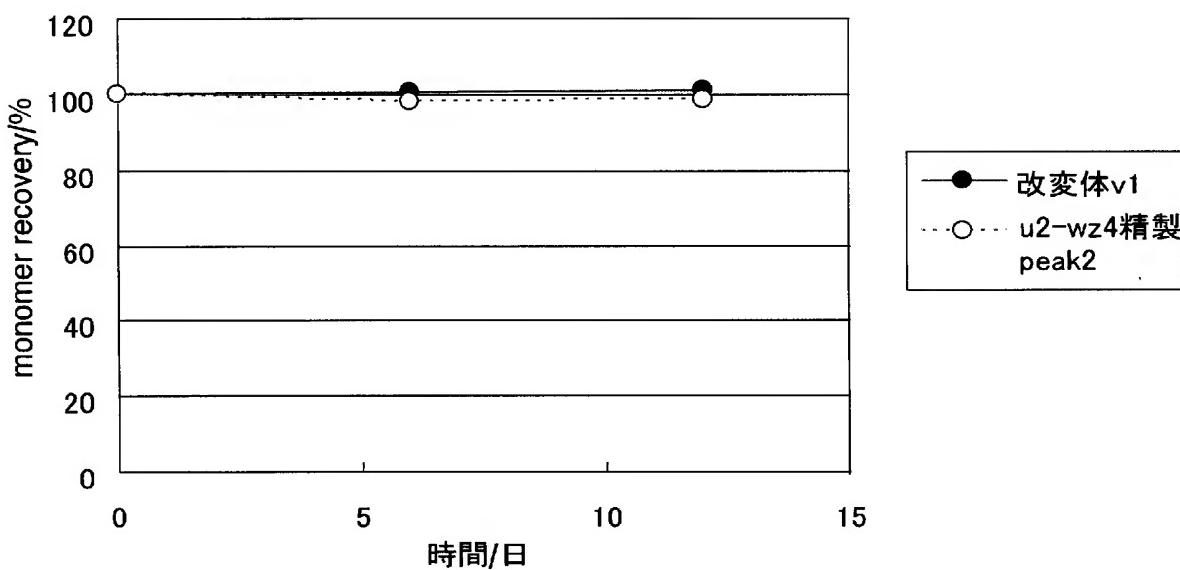
(B) BaF-monkey Mpl



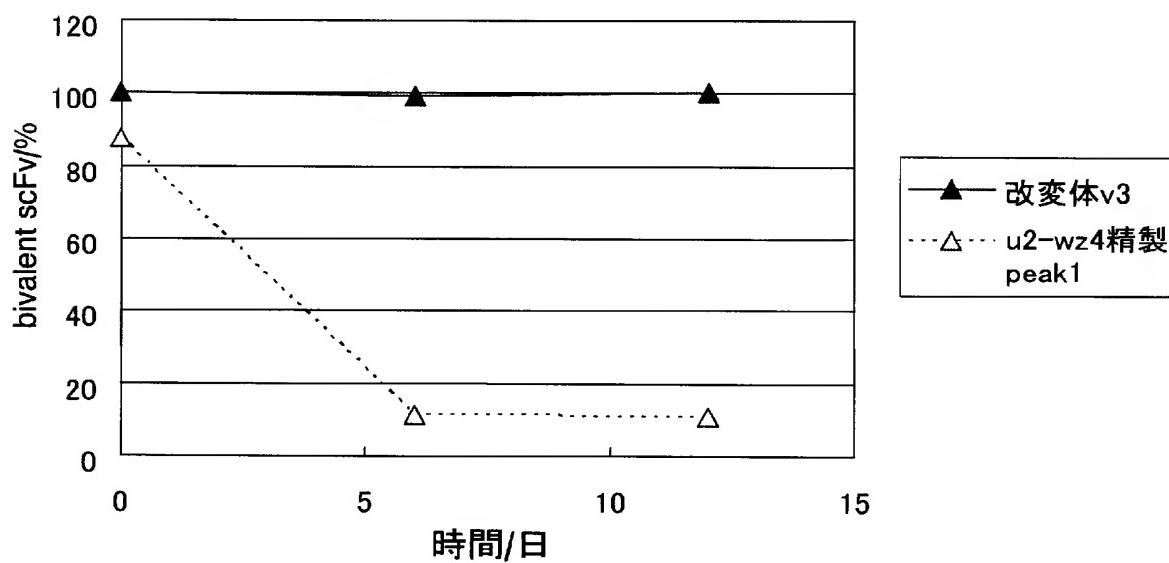
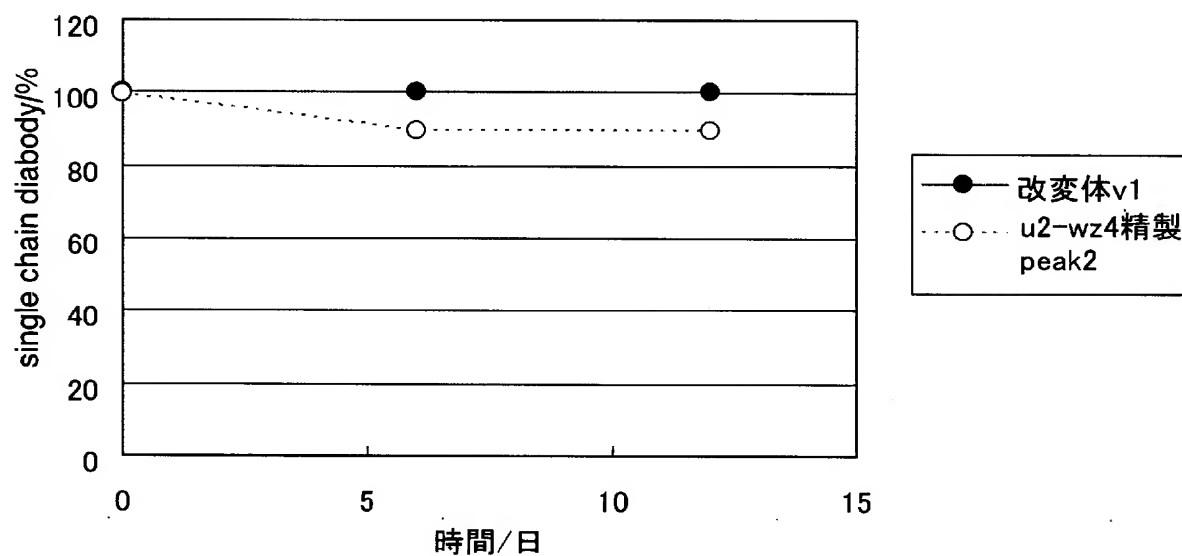
[図23]



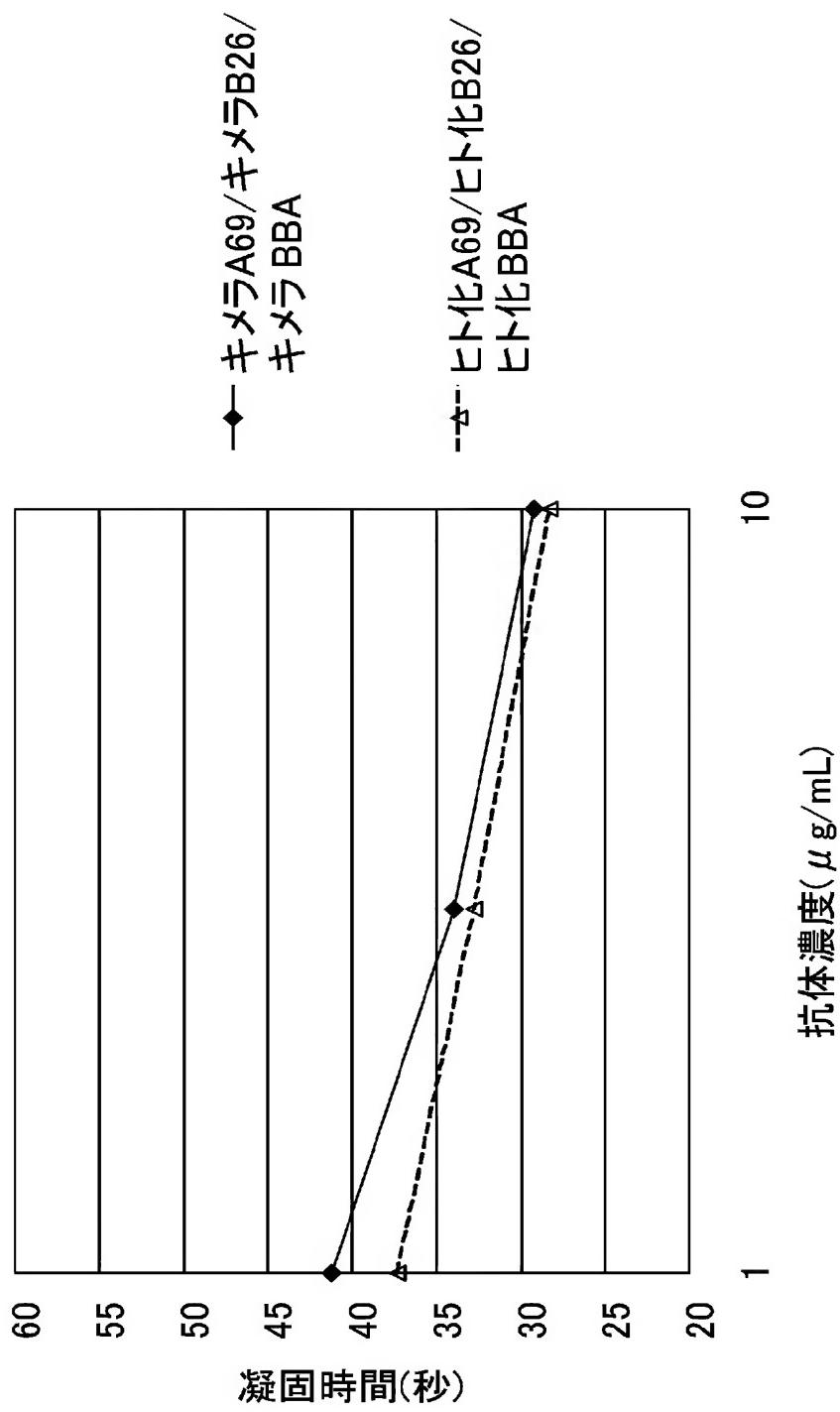
[図24]



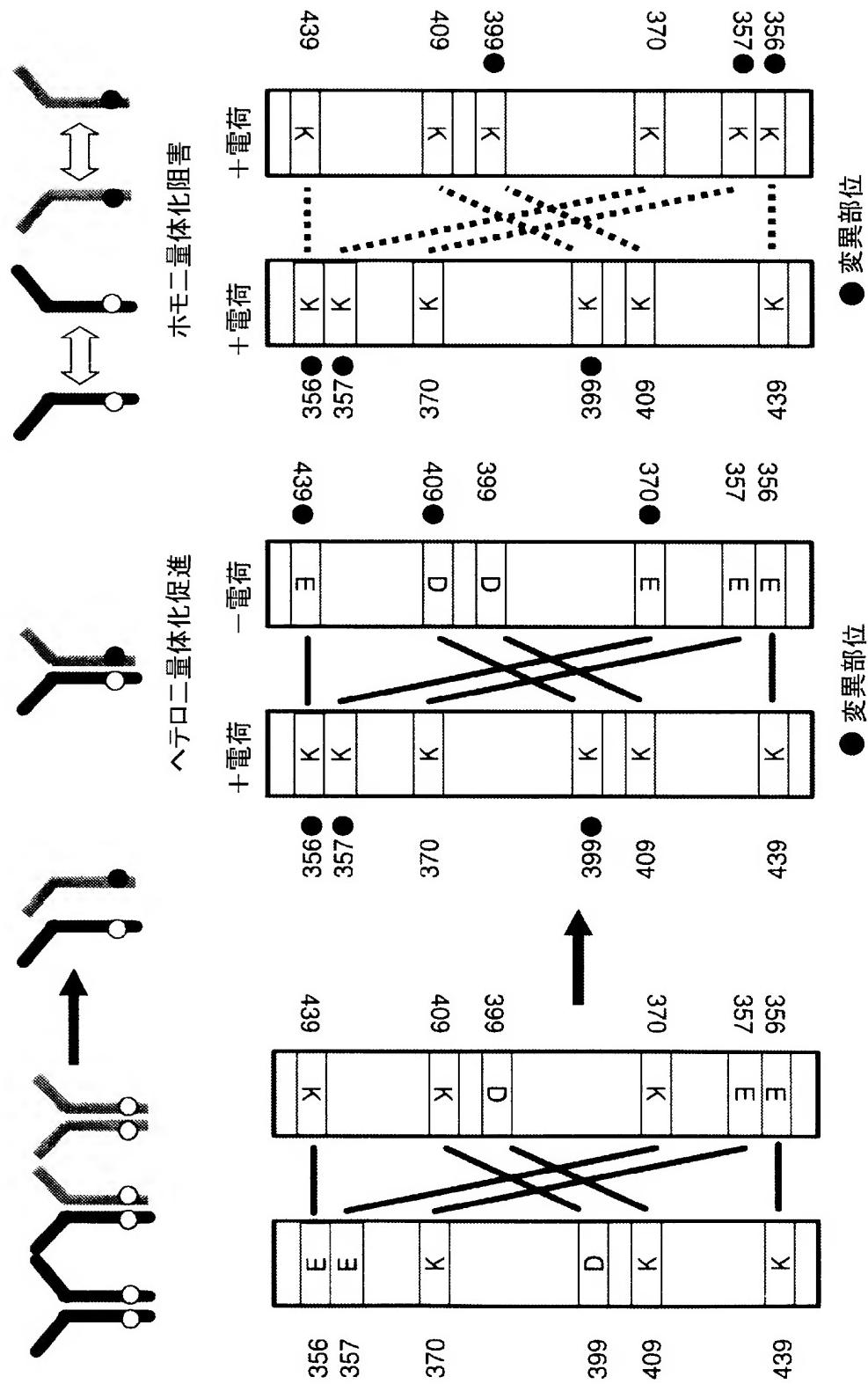
[図25]



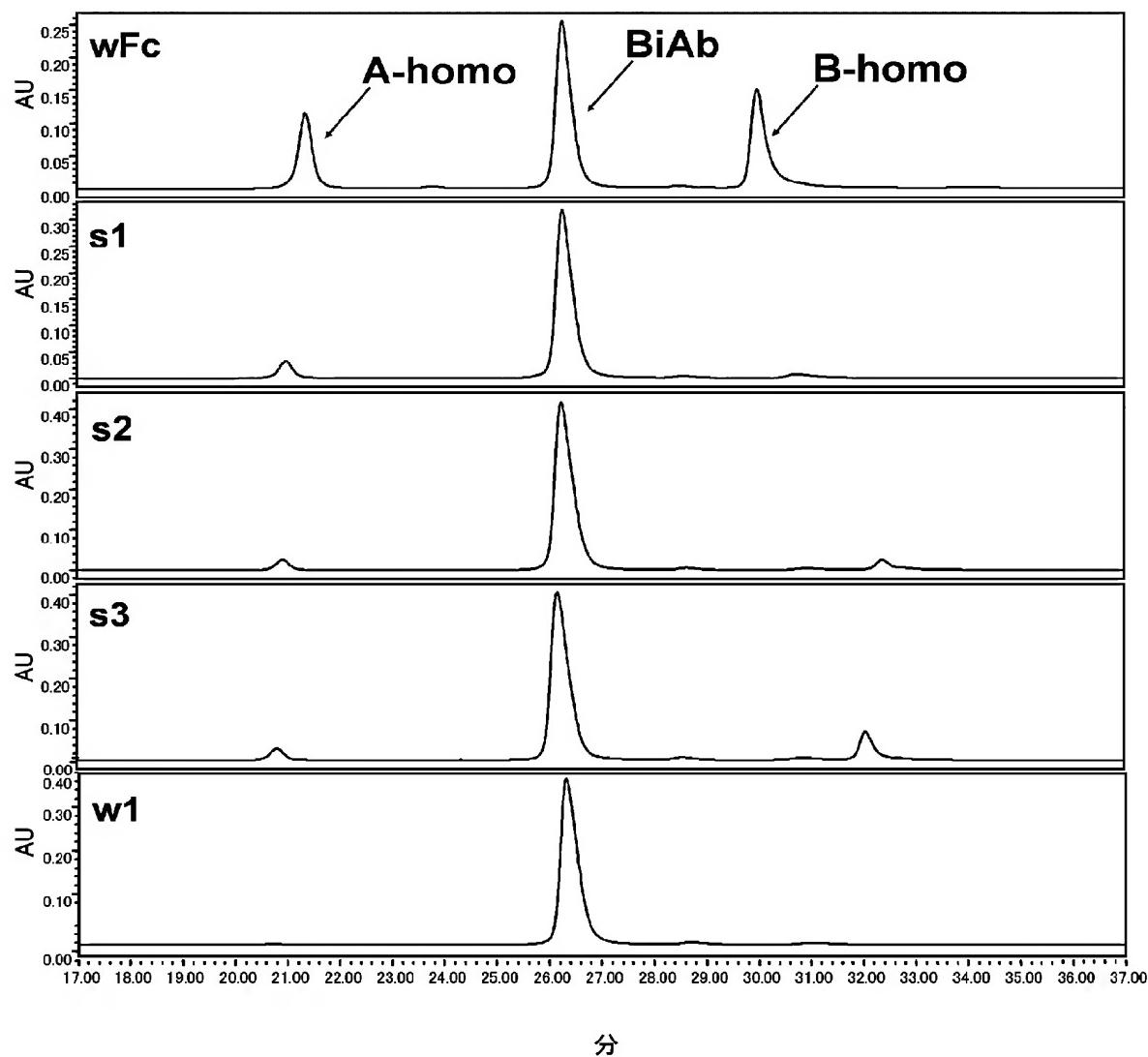
[図26]



[図27]



[図28]



[図29]

名称	A-Homo	BiAb	B-Homo
wild type	20	48	32
KiH	0	97	3
s1	8	87	5
s2	5	92	3
s3	3	92	6
w1	1	97	2
w2	0	94	6
w3	4	93	3

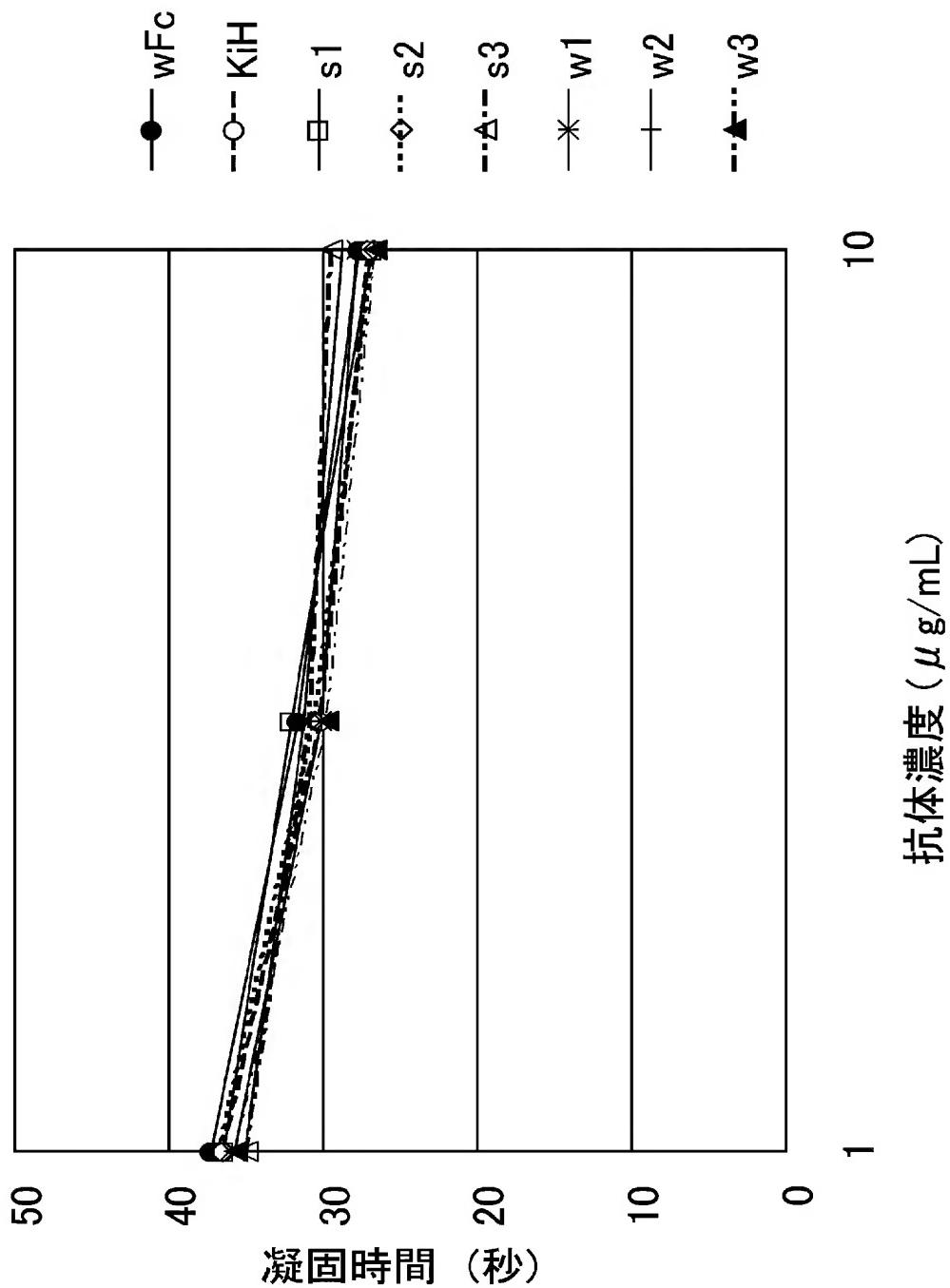
  

名称	A-Homo	BiAb	B-Homo
wild type	21	49	30
KiH	0	99	1
s1C	5	94	1
s2C	11	87	2
s3C	3	88	10
w3C	3	95	2
w3C2	6	93	1

[図30]

名称	モノマー残存/%
wild type	66
KiH	36
s2	39
s3	72
w3	47
s2C	81
s3C	79
w3C	83
w3C2	74

[図31]



[図32]

名称	A-Homo	BiAb	B-Homo
wild type	24	50	27
KiH	0	99	1
w1	0	98	2
w2	0	98	2
w3	4	94	2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306803

### A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12N15/09**(2006.01), **A61K39/395**(2006.01), **C07K16/18**(2006.01), **C12N1/15**(2006.01), **C12N1/19**(2006.01), **C12N1/21**(2006.01), **C12N5/10**(2006.01), **C12P21/02**(2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C12N15/09**(2006.01), **A61K39/395**(2006.01), **C07K16/18**(2006.01), **C12N1/15**(2006.01), **C12N1/19**(2006.01), **C12N1/21**(2006.01), **C12N5/10**(2006.01), **C12P21/02**(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JDream2)

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Sal-Man N. et al., Arginine mutations within a transmembrane domain of Tar, an Escherichia coli aspartate receptor, can drive homodimer dissociation and heterodimer association in vivo, Biochem.J., 2005 Jan. 1, Vol.385 (Pt 1), pages 29 to 36, particularly, page 29, lower right column, line 6th from the bottom to page 30, left column, line 23	1-97
Y	Kumar R. et al., The second PDZ domain of INAD is a type I domain involved in binding to eye protein kinase C. Mutational analysis and naturally occurring variants, J.Biol.Chem., 2001, Vol.276, No.27, pages 24971 to 24977, particularly, page 24971, right column, lines 25 to 31; page 24974, left column, lines 4 to 11; Fig. 2	1-97

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 June, 2006 (29.06.06)

Date of mailing of the international search report  
11 July, 2006 (11.07.06)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/306803

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-0866862 A (Celestar Lexico-Sciences Inc.), 18 March, 2004 (18.03.04), Particularly, abstract; Fig. 8; Par. No. [0019] & US 2005/0130224 A1 & EP 1510943 A1 & WO 03/107218 A1	1-97
Y	JP 11-500916 A (Genentech Inc.), 26 January, 1999 (26.01.99), Particularly, Claims; Figs. 1 to 4 & US 5731168 A & WO 96/027011 A1 & EP 812357 A1	17-23, 41-47, 68-97
A	Maity H. et al., Equilibrium unfolding of dimeric and engineered monomeric forms of lambda Cro (F58W) repressor and the effect of added salts: evidence for the formation of folded monomer induced by sodium perchlorate., Arch.Biochem.Biophys., 01 February, 2005 (01.02.05), Vol.434, No.1, pages 93 to 107	1-97
A	Liu X.Y. et al., Functional interactions between arginine-133 and aspartate-88 in the human reduced folate carrier: evidence for a charge-pair association, Biochem.J. 2001 , Vol.358(Pt), pages 511 to 516	1-97
A	WO 97/10354 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 20 March, 1997 (20.03.97), Particularly, page 84, 9th line from the bottom to page 90, 9th line from the bottom & US 6018032 A & EP 811691 A1	1-97
A	JP 8-500979 A1 (SMITH KLINE BEECHAM CORP.), 06 February, 1996 (06.02.96), Particularly, examples 4 to 6 & WO 94/05690 A1	1-97

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01), A61K39/395(2006.01), C07K16/18(2006.01), C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N1/21(2006.01), C12N5/10(2006.01), C12P21/02(2006.01)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01), A61K39/395(2006.01), C07K16/18(2006.01), C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N1/21(2006.01), C12N5/10(2006.01), C12P21/02(2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus(JDream2)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Sal-Man N et al, Arginine mutations within a transmembrane domain of Tar, an Escherichia coli aspartate receptor, can drive homodimer dissociation and heterodimer association in vivo, Biochem J, 2005 Jan 1, vol.385(Pt 1), p.29-36、特に第29頁右欄下から6行—第30頁左欄第23行等参照	1-97
Y	Kumar R et al, The second PDZ domain of INAD is a type I domain involved in binding to eye protein kinase C. Mutational analysis and naturally occurring variants, J Biol Chem, 2001, vol.276, no.27,	1-97

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 29.06.2006	国際調査報告の発送日 11.07.2006
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 9359

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	p.24971-24977、特に第 24971 頁右欄第 25-31 行、第 24974 頁左欄第 4-11 行、図 2 等参照	
Y	JP 2004-0866862 A (Celestar Lexico Sciences Inc) 2004.03.18, 特に要約、図 8,[0019]等& US 2005/0130224 A1 & EP 1510943 A1 & WO 03/107218 A1	1 - 9 7
A	JP 11-500916 A (Genentech Inc) 1999.01.26, 特に請求の範囲、図 1—図 4 等 & US 5731168 A & WO 96/027011 A1 & EP 812357 A1	1 7 - 2 3 , 4 1 - 4 7 , 6 8 - 9 7
A	Maity H et al, Equilibrium unfolding of dimeric and engineered monomeric forms of lambda Cro (F58W) repressor and the effect of added salts: evidence for the formation of folded monomer induced by sodium perchlorate., Arch Biochem Biophys, 2005 Feb 1, vol.434, no.1, p.93-107	1 - 9 7
A	Liu XY et al, Functional interactions between arginine-133 and aspartate-88 in the human reduced folate carrier: evidence for a charge-pair association, Biochem J. 2001 , vol.358(Pt 2), p.511-516	1 - 9 7
A	WO 97/10354 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 1997.03.20, 特に第 84 頁下から第 9 行—第 90 頁下から 9 行 & US 6018032 A & EP 811691 A1	1 - 9 7
A	JP 8-500979 A1 (SMITH KLINE BEECHAM CORP.) 1996.02.06, 特に実施例 4—6 参照& WO 94/05690 A1	1 - 9 7